



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 48/00		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/01158 (43) Date de publication internationale: 14 janvier 1999 (14.01.99)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/01400</p> <p>(22) Date de dépôt international: 30 juin 1998 (30.06.98)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 97/08233 30 juin 1997 (30.06.97) FR 60/067,488 1er décembre 1997 (01.12.97) US </p> <p>(71) Déposants (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond Aron, F-92160 Antony (FR). INSTITUT GUSTAVE ROUSSY [FR/FR]; 39, rue Camille Desmoulins, F-94805 Villejuif (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75016 Paris (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): BUREAU, Michel [FR/FR]; 1, square Sainte Clothilde, F-92210 Saint Cloud (FR). MIT, Lluis [FR/FR]; 22, allée des Vaupépins, F-91370 Verrières le Buisson (FR). SCHERMAN, Daniel [FR/FR]; 10, rue Erard, F-75012 Paris (FR).</p> <p>(74) Mandataire: DERNONCOUR, Roxane; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond Aron, F-92165 Antony Cedex (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i></p>	
<p>(54) Title: IMPROVED METHOD FOR TRANSFERRING NUCLEIC ACID INTO THE STRIPED MUSCLE AND COMBINATION THEREFOR</p> <p>(54) Titre: AMELIORATION DU TRANSFERT D'ACIDE NUCLEIQUE DANS LE MUSCLE STRIE ET COMBINAISON PERMETTANT LA MISE EN OEUVRE DU PROCEDE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns an improved method for transferring <i>in vivo</i> into the cells of striped muscles nucleic acids or nucleic acids combined with products for enhancing the efficacy of such transfers. The invention also concerns the combination of a nucleic acid and the transfer method for use in gene therapy.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention se rapporte à une amélioration du transfert <i>in vivo</i> dans les cellules des muscles striés d'acides nucléiques ou d'acides nucléiques associés à des produits permettant d'augmenter le rendement de tels transferts, et à la combinaison d'un acide nucléique et du procédé de transfert selon l'invention pour leur utilisation en thérapie génique.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Licichtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

**AMELIORATION DU TRANSFERT D'ACIDE NUCLEIQUE DANS LE MUSCLE STRIE
ET COMBINAISON PERMETTANT LA MISE EN OEUVRE DU PROCEDE**

La présente invention se rapporte à une amélioration très remarquable du transfert *in vivo* dans les cellules des muscles striés d'acides nucléiques ou d'acides nucléiques associés à des produits permettant d'augmenter le rendement de tels transferts, et à la combinaison d'un acide nucléique et du procédé de transfert selon l'invention pour leur utilisation pour la thérapie génique.

Le transfert de gènes dans une cellule donnée est à la base de la thérapie génique. Cependant, l'un des problèmes est de parvenir à faire pénétrer une quantité d'acide nucléique suffisante dans des cellules de l'hôte à traiter ; en effet, cet acide nucléique, en général un gène d'intérêt, doit être exprimé dans des cellules transfectées. L'une des approches retenue à cet égard a été l'intégration de l'acide nucléique dans des vecteurs viraux, en particulier dans des rétrovirus, des adénovirus ou des virus associés aux adénovirus. Ces systèmes mettent à profit les mécanismes de pénétration cellulaire développés par les virus, ainsi que leur protection contre la dégradation. Cependant, cette approche présente des inconvénients, et en particulier un risque de production de particules virales infectieuses susceptibles de dissémination dans l'organisme hôte, et, dans le cas des vecteurs rétroviraux, un risque de mutagénèse insertionnelle. De plus, la capacité d'insertion d'un gène thérapeutique ou vaccinal dans un génome viral demeure restreinte.

En tout état de cause, le développement de vecteurs viraux utilisables en thérapie génique impose d'avoir recours à des techniques complexes de virus défectifs et de lignées cellulaires de complémentation.

Une autre approche (Wolf et al. *Science* 247, 1465-68, 1990 ; Davis et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 7213-18, 1996) a donc consisté à administrer dans le muscle ou dans la circulation un acide nucléique de nature plasmidique, associé ou non à des composés destinés à favoriser sa transfection, comme des protéines, des liposomes, des lipides chargés ou des polymères cationiques tels que le polyéthylénimine, qui sont de bons agents de transfection *in vitro* (Behr et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6982-6, 1989 ; Felgner et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413-7, 1987 ; Boussif et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 7297-301, 1995).

Depuis la publication initiale de J.A. Wolff et al. montrant la capacité du tissu musculaire à incorporer de l'ADN injecté sous forme de plasmide libre (Wolff et al. *Science* 247, 1465-1468, 1990) de nombreux auteurs ont tenté d'améliorer ce

processus (Manthorpe et al., 1993, Human Gene Ther. 4, 419-431 ; Wolff et al., 1991, BioTechniques 11, 474-485). Quelques tendances se dégagent de ces essais, comme notamment :

- l'utilisation de solutions mécaniques pour forcer l'entrée de l'ADN dans les cellules, en adsorbant l'ADN sur des billes propulsées ensuite sur les tissus (« gene gun ») (Sanders Williams et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 2726-2730 ; Fynan et al., 1993, BioTechniques 11, 474-485). Ces procédés se sont avérés efficaces dans des stratégies de vaccination, mais ne touchent que les couches superficielles des tissus. Dans le cas du muscle, leur utilisation nécessiterait un abord chirurgical pour permettre d'accéder au muscle, car les particules ne traversent pas les tissus cutanés ;
- l'injection d'ADN, non plus sous forme de plasmide libre, mais associé à des molécules susceptibles de servir de véhicule facilitant l'entrée des complexes dans les cellules. Les lipides cationiques, utilisés dans de nombreux autres procédés de transfection, se sont avérés jusqu'à l'heure actuelle décevants quant à une application dans le tissu musculaire, car ceux qui ont été testés se sont montrés inhibiteurs de la transfection (Schwartz et al., 1996, Gene Ther. 3, 405-411). Il en est de même pour les peptides et polymères cationiques (Manthorpe et al., 1993, Human Gene Ther. 4, 419-431). Le seul cas d'association favorable semble être le mélange polyvinylalcool ou polyvinylpyrrolidone avec l'ADN. L'augmentation résultant de ces associations ne représente qu'un facteur inférieur à 10 par rapport à l'ADN injecté nu (Mumper et al., 1996, Pharmaceutical Research 13, 701-709) ;
- le prétraitement du muscle à injecter avec des solutions destinées à améliorer la diffusion et/ou la stabilité de l'ADN (Davis et al., 1993, Hum. Gene Ther. 4, 151-159), ou à favoriser l'entrée des acides nucléiques, par exemple l'induction de phénomènes de multiplication ou de régénération de cellules. Les traitements ont concerné en particulier l'utilisation d'anesthésiques locaux ou de cardiotoxine, de vasoconstricteurs, d'endotoxine ou d'autres molécules (Manthorpe et al., 1993, Human Gene Ther. 4, 419-431 ; Danko et al., 1994, Gene Ther. 1, 114-121 ; Vitadello et al., 1994, Hum. Gene Ther. 5, 11-18). Ces protocoles de prétraitement sont difficiles à gérer, la bupivacaïne en particulier nécessitant pour être efficace d'être injectée à des doses très proches des doses létales. La préinjection de sucre

hyperosmotique, destinée à améliorer la diffusion, n'augmente pas le niveau de la transfection dans le muscle (Davis et al., 1993).

L'électroporation, ou utilisation de champs électriques pour perméabiliser des cellules, est également utilisée *in vitro* pour favoriser la transfection d'ADN dans des cellules en culture. Toutefois, il était jusqu'à présent admis que ce phénomène répondait à un effet dépendant d'un seuil et que cette électroperméabilisation ne pouvait être observée que pour des champs électriques d'intensité relativement élevée, de l'ordre de 800 à 1 200 Volts/cm pour les cellules animales. Cette technique a également été proposée *in vivo* pour améliorer l'efficacité d'agents antitumoraux, comme la bléomycine, dans des tumeurs solides chez l'homme (brevet américain n° 5 468 228, L.M. Mir). Avec des impulsions de très courte durée (100 microsecondes), ces conditions électriques (800 à 1 200 Volts/cm) sont très bien adaptées au transfert intracellulaire de petites molécules. Ces conditions (impulsions de 100 microsecondes) ont été appliquées sans amélioration pour le transfert d'acides nucléiques *in vivo* dans le foie, où des champs inférieurs à 1 000 Volts/cm se sont révélés totalement inefficaces, et même inhibiteurs par rapport à l'injection d'ADN en l'absence d'impulsions électriques (brevet WO 97/07826 et Heller et al. FEBS Letters, 389, 225-8, 1996).

Cette technique présente d'ailleurs des difficultés d'application *in vivo*, car l'administration de champs d'une telle intensité peut provoquer des lésions tissulaires plus ou moins étendues, qui ne représentent pas un problème pour le traitement de tissus tumoraux mais qui peuvent représenter un inconvénient majeur pour le sujet sain ou pour le sujet malade lorsque l'acide nucléique est administré dans des tissus autres que les tissus tumoraux, en particulier dans le muscle strié.

Alors que toutes les études citées mentionnent la nécessité de champs électriques élevés, de l'ordre de 1 000 Volts/cm, pour être efficace *in vivo*, de manière vraiment inattendue et remarquable, les demandeurs ont à présent montré que le transfert d'acides nucléiques dans des muscles *in vivo* pouvait être augmenté de façon très importante, sans effets indésirables, en soumettant le muscle à des impulsions électriques d'intensité faible, par exemple de 100 ou de 200 Volts/cm, et d'une durée relativement longue. De plus, les demandeurs ont constaté que la grande variabilité d'expression du transgène observée dans l'art antérieur de transfert d'ADN dans le muscle était notablement réduite par le procédé selon l'invention.

C'est pourquoi, la présente invention concerne un procédé de transfert d'acides nucléiques dans un ou plusieurs muscles striés *in vivo*, dans lequel les cellules des muscles sont mises en contact avec l'acide nucléique à transférer, par administration directe dans le tissu ou par administration topique ou systémique, et 5 dans lequel le transfert est assuré par application auxdits muscles d'une ou de plusieurs impulsions électriques d'une intensité comprise entre 1 et 800 Volts/cm.

De préférence, l'intensité du champ est comprise entre 4 et 400 Volts/cm et la durée totale d'application est supérieure à 10 millisecondes. Le nombre d'impulsions utilisées est par exemple de 1 à 100 000 impulsions et la fréquence des 10 impulsions est comprise entre 0,1 et 1000 Hertz. De préférence la fréquence des impulsions est comprise entre 0,2 et 100 Hertz. Les impulsions peuvent être aussi délivrées de manière irrégulière et la fonction qui décrit l'intensité du champ en fonction du temps peut être variable. A titre d'exemple, le champ électrique délivré peut résulter de la combinaison d'au moins un champ d'une intensité > à 400 V/cm et 15 de préférence comprise entre 500 et 800 Volts/cm, de durée unitaire courte (< 1 msec), suivi de une ou plusieurs impulsions d'intensité plus faible , par exemple < 400 Volts/cm, et de préférence < 200 Volts /cm et de durée unitaire plus longue (> 1 msec). L'intégrale de la fonction décrivant la variation du champ électrique avec le temps est supérieure à 1 kVxmsec/cm. Selon un mode préféré de l'invention, cette 20 intégrale est supérieure ou égale à 5 kVxmsec/cm.

Selon un mode préféré de l'invention, l'intensité de champ des impulsions est comprise entre 30 et 300 Volts/cm.

Les impulsions électriques sont choisies parmi les impulsions à ondes carrées, les champs électriques générant des ondes à décroissance exponentielle, des 25 ondes unipolaires oscillantes de durée limitée, des ondes bipolaires oscillantes de durée limitée, ou d'autres formes d'ondes. Selon un mode préféré de l'invention, les impulsions électriques sont des impulsions à ondes carrées.

L'administration d'impulsions électriques peut être réalisée par toute méthode connue de l'homme du métier, par exemple :

30

- système d'électrodes externes placées de part et d'autre du tissu à traiter, notamment électrodes non invasives placées au contact de la peau,
- système d'électrodes implantées dans les tissus,

- système d'électrodes/injecteur permettant l'administration simultanée des acides nucléiques et du champ électrique.

Dans le cadre de la présente invention les termes transfert d'ADN ou d'acides nucléiques par application d'une ou plusieurs impulsions électriques, ainsi que les termes électrotransfert ou encore électrotransfection doivent être considérés comme équivalents et désignent le transfert d'acides nucléiques ou d'ADN par application ou en présence d'un champ électrique.

L'administration étant réalisée *in vivo*, il est parfois nécessaire d'avoir recours à des produits intermédiaires assurant la continuité électrique avec des 10 électrodes externes non invasives. Il s'agira par exemple d'électrolyte sous forme de gel.

Les acides nucléiques peuvent être administrés par tout moyen approprié, mais sont de préférence injectés *in vivo* directement dans le muscle ou administrés par une autre voie, locale ou systémique, qui les rend disponibles à l'endroit d'application. 15 Les acides nucléiques peuvent être administrés avec des agents permettant ou facilitant le transfert, comme cela a été mentionné précédemment. Notamment, ces acides nucléiques peuvent être libres en solution ou associés à des agents synthétiques, ou portés par des vecteurs viraux. Les agents synthétiques peuvent être des lipides ou des polymères connus de l'homme du métier, ou bien 20 encore des éléments de ciblage permettant la fixation sur la membrane des tissus cibles. Parmi ces éléments, on peut citer des vecteurs portant des sucres, des peptides, des anticorps ou des récepteurs hormonaux.

On conçoit, dans ces conditions de l'invention, que l'administration des 25 acides nucléiques puisse précéder, être simultanée ou même suivre l'application des champs électriques.

C'est pourquoi, la présente invention a également pour objet un acide nucléique et un champ électrique d'une intensité comprise entre 1 et 800 Volts/cm, comme produit de combinaison pour leur administration simultanée, séparée ou étalée dans le temps, au muscle strié *in vivo*. De préférence, l'intensité du champ est 30 comprise entre 4 et 400 Volts/cm et, de manière encore plus préférée, l'intensité du champ est comprise entre 30 et 300 Volts/cm.

Le procédé selon la présente invention est utilisable dans la thérapie génique, c'est-à-dire la thérapie dans laquelle l'expression d'un gène transféré, mais

également la modulation ou le blocage d'un gène, permet d'assurer le traitement d'une pathologie particulière.

De préférence, les cellules musculaires sont traitées dans le but d'une thérapie génique permettant :

- 5 • soit la correction des dysfonctionnements des cellules musculaires elles-mêmes (par exemple pour le traitement des myopathies liées à des déficiences génétiques),
- soit la sauvegarde et/ou la régénération de la vascularisation ou de l'innervation du muscle et d'autres muscles ou organes par des facteurs trophiques, neurotrophiques et angiogéniques produits par le transgène,
- 10 • soit la transformation du muscle en organe sécréteur de produits conduisant à un effet thérapeutique tels que le produit du gène lui-même (par exemple facteurs de régulation de thrombose et d'hémostase, facteurs trophiques, hormones comme l'insuline ou autres) ou tels qu'un métabolite actif synthétisé dans le muscle grâce à l'adjonction du gène thérapeutique,
- 15 • soit une application vaccinale ou immunostimulante.

Un autre objet de l'invention est l'association des impulsions électriques d'un champ à des compositions contenant les acides nucléiques formulées en vue de toute administration permettant d'accéder à un muscle strié par voie topique, cutanée, orale, vaginale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, 20 intra-oculaire, transdermique, etc. De préférence, les compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe au niveau de l'organe désiré, ou pour toute autre administration. Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par 25 addition selon le cas d'eau stérilisée ou de serum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Les doses d'acide nucléique utilisées pour l'injection ainsi que le nombre d'administrations et le volume des injections peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de 30 la durée du traitement recherchée.

Les acides nucléiques peuvent être d'origine synthétique ou biosynthétique, ou extraits de virus ou de cellules procaryotes ou de cellules eucaryotes provenant d'organismes unicellulaires (par exemple, levures) ou

pluricellulaires. Ils peuvent être administrés en association de tout ou partie des composants de l'organisme d'origine et/ou du système de synthèse.

L'acide nucléique peut être un acide désoxyribonucléique ou un acide ribonucléique. Il peut s'agir de séquences d'origine naturelle ou artificielle, et 5 notamment d'ADN génomique, d'ADNc, d'ARNm, d'ARNt et d'ARNr, de séquences hybrides ou de séquences synthétiques ou semisynthétiques d'oligonucléotides modifiés ou non. Ces acides nucléiques peuvent être obtenus par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par ciblage de banques, par synthèse 10 chimique ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par ciblage de banques. Ils peuvent être modifiés chimiquement.

En particulier, l'acide nucléique peut être un ADN ou un ARN sens ou antisens ou à propriété catalytique comme un ribozyme. Par « antisens », on entend 15 un acide nucléique ayant une séquence complémentaire à une séquence cible, par exemple une séquence d'ARNm dont on cherche à bloquer l'expression par hybridation sur la séquence cible. Par « sens », on entend un acide nucléique ayant une séquence homologue ou identique à une séquence cible, par exemple une séquence qui se lie à 20 un facteur de transcription protéique et impliqué dans l'expression d'un gène donné. Selon un mode de réalisation préféré, l'acide nucléique comporte un gène d'intérêt et des éléments permettant l'expression dudit gène d'intérêt. Avantageusement, le fragment d'acide nucléique est sous forme d'un plasmide.

Les acides désoxyribonucléiques peuvent être simple ou double brin, de même que des oligonucléotides courts ou des séquences plus longues. Ils peuvent 25 porter des gènes thérapeutiques, des séquences régulatrices de la transcription ou de la réPLICATION, ou des régions de liaison à d'autres composants cellulaires, etc. Au sens de l'invention, on entend par « gène thérapeutique » notamment tout gène codant pour un ARN ou pour un produit protéique ayant un effet thérapeutique. Le produit protéique codé peut être une protéine, un peptide, etc. Ce produit protéique peut être homologue vis-à-vis de la cellule cible (c'est-à-dire un produit qui est normalement exprimé dans la cellule cible lorsque celle-ci ne présente aucune pathologie). Dans ce cas, l'expression du transgène permet par exemple de pallier à une expression insuffisante dans la cellule ou à l'expression d'une protéine inactive ou faiblement active en raison d'une modification, ou permet encore de surexprimer ladite protéine.

Le gène thérapeutique peut aussi coder pour un mutant d'une protéine cellulaire, ayant une stabilité accrue, une activité modifiée, etc. Le produit protéique peut également être hétérologue vis-à-vis de la cellule cible. Dans ce cas, une protéine exprimée peut par exemple compléter ou apporter une activité déficiente dans la cellule (traitement des myopathies ou des déficits enzymatiques), ou permettre de lutter contre une pathologie, ou stimuler une réponse immunitaire.

Parmi les produits thérapeutiques au sens de la présente invention, on peut citer plus particulièrement les gènes codant pour

- 10 - les enzymes, comme l' α -1-antitrypsine, les proteinase (métalloproteinases, urokinase, uPA, tPA,...streptokinase), les protéases clivant des précurseurs pour libérer des produits actifs (ACE, ICE,...), ou leurs antagonistes (TIMP-1, tissue plasminogen activator inhibitor PAI, TFPI)
- les dérivés sanguins comme les facteurs impliqués dans la coagulation : facteurs VII, VIII, IX, les facteurs du complement, la thrombine,
- les hormones, ou les enzymes impliquées dans la voie de synthèse des hormones, ou les facteurs impliqués dans le contrôle de la synthèse ou de l'excrétion ou de la sécrétion des hormones, telles que l'insuline, les facteurs proches de l'insuline (IGF), ou l'hormone de croissance, l'ACTH, les enzymes de synthèse des hormones sexuelles,
- 15 - les lymphokines et cytokines : interleukines, chemokines (CXC et CC), interférons, TNF, TGF, facteurs chimiotactiques ou activateurs comme MIF, MAF, PAF, MCP-1, l'eotaxine, LIF, etc. (brevet français n° 92 03120),
- les facteurs de croissance, par exemple les IGF, EGF, FGF, KGF, NGF, PDGF, PIGF, HGF, proliférin
- 20 - les facteurs angiogéniques tels que les VEGF ou FGF, angiopoietine 1 ou 2, l'endotheline
- les enzymes de synthèse de neurotransmetteurs,
- les facteurs trophiques, en particulier neurotrophiques pour le traitement des maladies neurodégénératives, des traumatismes ayant endommagé le système nerveux,
- 25 - ou des dégénérescences rétiennes, tels que les membres de la famille des neurotrophines tels que le NGF, BDNF, NT3, NT4/5, NT6 leurs dérivés et gènes apparentés - les membres de la familles du CNTF tels que le CNTF, l'axokine, le LIF et leurs dérivés - l'IL6 et ses dérivés - la cardiotrophine et ses dérivés - le GDNF et ses

dérivés - les membres de la famille des IGF, tels que l'IGF-1, l'IFGF-2 et leurs dérivés

- les membres de la famille de FGF, tels que le FGF 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et leurs dérivés, le TGF β
- les facteurs de croissance osseuse,

5 - les facteurs hématopoïétiques, comme erythropoietine, les GM-CSF, M-CSF, LIF, etc.,

- les protéines de l'architecture cellulaire comme la dystrophine ou une minidystrophine (brevet français n° 91 11947), , les gènes suicides (thymidine kinase, cytosine déaminase, enzymes à cytochrome P450), les gènes de l'hémoglobine ou d'autres

10 transporteurs protéiques,

- les gènes correspondant aux protéines impliquées dans le métabolisme des lipides, de type apolipoprotéine choisie parmi les apolipoprotéines A-I, A-II, A-IV, B, C-I, C-II, C-III, D, E, F, G, H, J et apo(a), les enzymes du métabolisme comme par exemple les lipases, la lipoprotéine lipase, la lipase hépatique, la lécithine cholestérol acyltransférase, la 7 alpha cholestérol hydroxylase, la phosphatidyl acide phosphatase; ou encore des protéines de transfert de lipides comme la protéine de transfert des esters de cholestérol et la protéine de transfert des phospholipides, une protéine de liaison des HDL ou encore un récepteur choisi par exemple parmi les récepteurs aux LDL, les récepteurs des chylomicrons-remnants et les récepteurs scavenger, etc. On peut, de plus, ajouter la leptine pour le traitement de l'obésité.

15 - les facteurs régulant la pression sanguine, comme les enzymes impliquées dans le métabolisme du NO, l'angiotensine, la bradykinine, vasopressine, l'ACE, la rénine, les enzymes codant pour les mécanismes de synthèse ou de relargage des prostaglandines, du thromboxane, ou de l'adenosine, les récepteurs de l'adénosine, les kallikreines et

20 kallistatines, ANP, ANF, les facteurs diurétiques ou antidiurétiques, les facteurs impliqués dans la synthèse, le métabolisme ou le relargage des médiateurs comme l'histamine, la sérotonine, les cathécholamines, les neuropeptides,

25 - les facteurs anti-angiogéniques comme le ligand de Tie-1 et de Tie-2, l'angiotstatine, le facteur ATF, les dérivés du plasminogène, l'endothéline, les thrombospondines 1 et 2, le PF-4, l'interféron α ou β , l'interleukine 12, le TNF α , le récepteur de l'urokinase, flt1, KDR, PAI1, PAI2, TIMP1, le fragment prolactine

30 - les facteurs protégeant contre l'apoptose, comme la famille AKT,

- les protéines susceptibles d'induire une mort cellulaire, soit actives par elles-mêmes comme les caspases, soit de type "pro-drogues" nécessitant une activation par d'autres facteurs, soit les protéines activant des pro-drogues en agent provoquant une mort cellulaire, comme la thymidine kinase du virus herpétique, les désaminases, permettant 5 en particulier d'envisager des thérapies anti-cancéreuses,
- les protéines impliquées dans les contacts et l'adhésion inter-cellulaires : VCAM, PECAM, ELAM, ICAM, intégrines, catenines,
- les protéines de la matrice extra-cellulaire,
- les protéines impliquées dans la migration des cellules

10 - les protéines de type transduction du signal, type FAK, MEKK, p38 kinase, tyrosines kinases, serines-threonines kinases,

- les protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (p21, p16, cyclines, ...) ainsi que les protéines mutantes ou dérivées dominant négatif bloquant le cycle cellulaire et pouvant le cas échéant induire l'apoptose.

15 - les facteurs de transcription : jun, fos, AP1, p53,...et les protéines de la cascade de signalisation de p53.

- les protéines de structure de la cellule, comme les filaments intermédiaires (vimentine, desmine, keratines), la dystrophine, les protéines impliquées dans la contractilité et le contrôle de la contractibilité musculaire, en particulier les protéines 20 impliquées dans le métabolisme calcique et les flux de calcium dans les cellules (SERCA, ...).

Dans les cas de protéines fonctionnant par des systèmes ligand et récepteurs, il est envisageable d'utiliser le ligand ou le récepteur (ex. FGF-R, VEGF-R, ...). On peut également citer des gènes codant pour des fragments ou des mutants de protéines de 25 ligands ou de récepteurs, notamment des protéines précitées, présentant soit une activité supérieure à la protéine entière, soit une activité antagoniste, voire même de type "dominant négatif" par rapport à la protéine initiale (par exemple fragments de récepteurs inhibant la disponibilité de protéines circulantes, associés ou non avec des séquences induisant une sécrétion de ces fragments par rapport à un ancrage dans la 30 membrane cellulaire, ou d'autres systèmes de modification du trafic intracellulaire de ces systèmes ligand-récepteurs de façon à détourner la disponibilité d'un des éléments) soit même possédant une activité propre distincte de celle de la protéine totale (ex. ATF).

Parmi les autres protéines ou peptides pouvant être sécrétés par le muscle, il est important de souligner les anticorps, les fragments variables d'anticorps simple chaîne (ScFv) ou tout autre fragment d'anticorps possédant des capacités de reconnaissance pour son utilisation en immunothérapie, par exemple pour le traitement 5 des maladies infectieuses, des tumeurs, des maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaques (anticorps antiidiotype), ainsi que les ScFv se fixant sur les cytokines pro-inflammatoires telles que par exemple IL1 et TNF α pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde. D'autres protéines d'intérêt sont, de façon non limitative, des 10 récepteurs solubles, comme par exemple le récepteur CD4 soluble ou le récepteur soluble du TNF pour la thérapie anti-HIV, le récepteur TNF α ou le récepteur soluble IL1 pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde, le récepteur soluble de l'acétylcholine pour le traitement de la myasthénie ; des peptides substrats ou inhibiteurs d'enzymes, ou bien des peptides agonistes ou antagonistes de récepteurs ou de protéines 15 d'adhésion comme par exemple pour le traitement de l'asthme, de la thrombose de la resténose, des métastases ou de l'inflammation ; des protéines artificielles, chimériques ou tronquées. Parmi les hormones d'intérêt essentiel, on peut citer l'insuline dans le cas du diabète, l'hormone de croissance et la calcitonine. On peut citer encore des 20 protéines capables d'induire une immunité antitumorale ou stimuler la réponse immunitaire (IL2, GM-CSF, IL12, etc.). Enfin on peut citer les cytokines qui diminuent la réponse T_{H1} telles que IL10, IL4 et IL13.

Les nombreux exemples qui précèdent et ceux qui suivent illustrent l'étendue potentielle du champ d'application de la présente invention.

L'acide nucléique thérapeutique peut également être un gène ou une 25 séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent, par exemple, être transcrites dans la cellule cible en ARN complémentaire d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans le brevet européen n° 140 308. Les gènes thérapeutiques comprennent 30 également les séquences codant pour des ribozymes, qui sont capables de détruire sélectivement des ARN cibles (brevet européen n° 321 201).

Comme indiqué plus haut, l'acide nucléique peut également comporter un ou plusieurs gènes codant pour un peptide antigénique, capable de générer chez

l'homme ou l'animal une réponse immunitaire. Dans ce mode particulier de mise en oeuvre, l'invention permet donc la réalisation soit de vaccins, soit de traitements immunothérapeutiques appliqués à l'homme ou à l'animal, notamment contre des microorganismes, des virus ou des cancers. Il peut s'agir notamment de peptides
5 antigéniques spécifiques du virus d'Epstein Barr, du virus HIV, du virus de l'hépatite B (brevet européen n° 185 573), du virus de la pseudo-rage, du « syncitia forming virus », d'autres virus ou encore d'antigènes spécifiques de tumeurs comme les protéines MAGE (brevet européen n° 259 212), telles que les protéines MAGE 1,
10 MAGE 2, ou des antigènes pouvant stimuler une réponse anti-tumorale telles que des protéines heat shock bactériennes.

Préférentiellement, l'acide nucléique comprend également des séquences permettant et/ou favorisant l'expression dans le muscle du gène thérapeutique et/ou du gène codant pour le peptide antigénique. Il peut s'agir des séquences qui sont naturellement responsables de l'expression du gène considéré lorsque ces séquences sont susceptibles de fonctionner dans la cellule transfectée. Il peut également s'agir de séquences d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire transfecter. Parmi les promoteurs eucaryotes, on peut utiliser tout promoteur ou séquence dérivée stimulant ou réprimant la transcription d'un gène de façon spécifique ou non, forte ou faible. Il peut s'agir en particulier de promoteurs ubiquitaires (HPRT, vimentine, α -actine, tubuline, etc.) , de promoteurs de gènes thérapeutiques (type MDR, CFTR, etc.), de promoteurs spécifiques de tissus (type promoteurs des gènes de la desmine, des myosines, de créatine kinase, de phophoglycérate kinase) ou encore de promoteurs répondant à un stimulus tels que des promoteurs répondant aux hormones naturelles (récepteur des hormones stéroïdes, récepteur de l'acide rétinoïque, etc.) ou un promoteur régulé par les antibiotiques (tétracycline, rapamycine, etc), de promoteurs répondant à un régime alimentaire comme les promoteurs répondant aux fibrates, ou d'autres promoteurs répondant à d'autres molécules d'origine naturelle ou synthétique. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs des gènes EIA de l'adénovirus, MLP, ou de

promoteurs issus des génomes des virus CMV, RSV, SV40, etc. Il peut s'agir de promoteurs inductibles ou répressibles. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, permettant une expression conditionnelle, transitoire, une expression tissu-spécifique ou majoritaire,
5 etc.

Par ailleurs, l'acide nucléique peut également comporter, en particulier en amont du gène thérapeutique, une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle du produit thérapeutique, mais il peut également s'agir
10 de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle. L'acide nucléique peut également comporter une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé vers un compartiment particulier de la cellule, comme par exemple les peroxisomes, les lysosomes, et les mitochondries pour le traitement par exemple des maladies génétiques mitochondrielles.
15

D'autres gènes présentant un intérêt ont été notamment décrits par McKusick, V.A. Mendelian (Inheritance in man, catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive, and X-linked phenotypes. Eighth edition. John Hopkins University Press (1988)), et dans Stanbury, J.B. et al. (The metabolic basis of inherited disease, Fifth edition. McGraw-Hill (1983)). Les gènes d'intérêt recouvrent les protéines impliquées dans le métabolisme des acides aminés, des lipides et des autres constituants de la cellule.
20

On peut ainsi citer de manière non limitative les gènes associés aux maladies du métabolisme des carbohydrates comme par exemple fructose-1-phosphate aldolase, fructose-1,6-diphosphatase, glucose-6-phosphatase, α -1,4-glucosidase
25 lysosomale, amylo-1,6-glucosidase, amylo-(1,4 :1,6)-transglucosidase, phosphorylase musculaire, phosphofructokinase musculaire, phosphorylase-b-kinase, galactose-1-phosphate uridyl transférase, toutes les enzymes du complexe pyruvate déshydrogénase, pyruvate carboxylase, 2-oxoglutarate glyoxylase carboxylase, D-glycérate déhydrogénase.
30

On peut également citer :

- les gènes associés avec des maladies du métabolisme des amino-acides comme par exemple phénylalanine hydroxylase, dihydrobioptérine synthétase, tyrosine aminotransférase, tyrosinase, histidinase, fumarylacéo-acétase, glutathion synthétase,

5 γ -glutamylcystéine synthétase, ornithine- δ -aminotransférase, carbamoylphosphate synthétase, ornithine carbamoyltransférase, argininosuccinate synthétase, argininosuccinate lyase, arginase, L-lysine déhydrogénase, L-lysine kétoglutarate réductase, valine transaminase, leucine isoleucine transaminase, décarboxylase des 2-
10 céto-acides à chaîne ramifiée, isovaléryl-CoA déhydrogénase, acyl-CoA déhydrogénase, 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA lyase, acétoacétyl-CoA 3-kétothiolase, propionyl-CoA carboxylase, méthylmalonyl-CoA mutase, ATP :cobalamine adénosyltransférase, dihydrofolate réductase, méthylène tétrahydrofolate réductase, cystathionine β -synthétase, le complexe sarcosine déhydrogénase, les protéines appartenant au système de clivage de la glycine, β -alanine transaminase, carnosinase sérique, homocarnosinase cérébrale.

15 - Les gènes associés avec des maladies du métabolisme des graisses et des acides gras, comme par exemple lipoprotéine lipase, apolipoprotéine C-II, apolipoprotéine E, d'autres apolipoprotéines, lécithine cholestérolacyltransférase, récepteur des LDL, stérol hydroxylase du foie, « acide phytanique » α -hydroxylase.

20 - Les gènes associés avec des déficiences lysosomales, comme par exemple α -L-iduronidase lysosomale, iduronate sulfatase lysosomale, héparan N-sulfatase lysosomale, N-acétayl- α -D-glucosaminidase lysosomale, acétyl-CoA : α -glucosamine N-acétyltransférase lysosomale, N-acétyl- α -D-glucosamine 6-sulfatase lysosomale, galactosamine 6-sulfate sulfatase lysosomale, β -galactosidase lysosomale, arylsulfatase B lysosomale, β -glucuronidase lysosomale, N-acétylglucosaminyl-phosphotransférase, α -D-mannosidase lysosomale, α -neuraminidase lysosomale, aspartylglycosaminidase lysosomale, α -L-fucosidase lysosomale, lipase acide lysosomale, céramidase acide lysosomale, sphingomyelinase lysosomale, glucocérébrosidase lysosomale et galactocérébrosidase lysosomale, galactosylcéramidase lysosomale, arylsulfatase A lysosomale, α -galactosidase A, β -galactosidase acide lysosomale, chaîne α de l'hexosaminidase A lysosomale.

30 On peut également citer, de façon non restrictive, les gènes associés avec des maladies du métabolisme des stéroïdes et des lipides, les gènes associés avec des maladies du métabolisme des purines et des pyrimidines, les gènes associés à des maladies du métabolisme de la porphyrine et de l'hème, les gènes associés à des maladies du métabolisme du tissu conjonctif, des s et des os ainsi que les gènes associés avec des maladies du sang et des organes hématopoïétiques, des muscles

(myopathie), du système nerveux (maladies neurodégénératives) ou de l'appareil circulatoire (traitement des ischémies et de la sténose par exemple) et les gènes impliqués dans les maladies génétiques mitochondrielles.

5 Dans le procédé suivant l'invention, l'acide nucléique peut être associé à tout type de vecteurs ou toute combinaison de ces vecteurs permettant d'améliorer le transfert de gènes, par exemple, de façon non limitative, à des vecteurs tels que des virus, des agents synthétiques ou biosynthétiques (par exemple lipidiques, polypeptidiques, glycosidiques ou polymériques), ou encore des billes propulsées ou
10 non. Les acides nucléiques peuvent aussi être injectés dans un muscle qui a été soumis à un traitement visant à améliorer le transfert de gènes, par exemple un traitement de nature pharmacologique en application locale ou systémique, ou un traitement enzymatique, perméabilisant (utilisation de tensioactifs), chirurgical, mécanique, thermique ou physique.

15 L'avantage de l'utilisation du muscle en thérapie génique réside dans de nombreux facteurs :

- la stabilité remarquable de l'expression des transgènes, supérieure à plusieurs mois, et permettant donc la production stable et soutenue d'une protéine thérapeutique intramusculaire ou sécrétée,
- 20 • la facilité d'accès au tissu musculaire, permettant une administration directe, rapide et non dangereuse dans un organe non vital,
- le volume important de la masse musculaire, permettant de multiples sites d'administration,
- la capacité sécrétrice amplement démontrée du muscle.

25 A ces avantages, s'ajoute la sécurité apportée par le traitement local lié à l'utilisation de champs électriques locaux et ciblés.

 De par l'ensemble de ces avantages et la sécurité liée à l'utilisation de champs faibles, la présente invention pourrait s'appliquer au niveau du muscle cardiaque pour le traitement de cardiopathies, par exemple en utilisant un défibrillateur
30 adapté. Elle pourrait s'appliquer aussi au traitement de la resténose par l'expression de gènes inhibiteurs de la prolifération des cellules musculaires lisses comme la protéine GAX.

La combinaison de champs peu intenses et de durées d'administration longues appliquée notamment aux muscles *in vivo* améliore la transfection des acides nucléiques sans amener de détériorations notables des tissus. Ces résultats améliorent le rendement des transferts d'ADN dans le cadre de la thérapie génique mettant en oeuvre les acides nucléiques.

En conséquence, les avantages du tissu musculaire associés au procédé selon l'invention permettent, pour la première fois, d'envisager de produire par thérapie génique un agent à des doses physiologiques et/ou thérapeutiques, soit dans les cellules musculaires, soit sécrété dans leur voisinage ou dans la circulation sanguine ou lymphatique. De plus, le procédé selon l'invention permet, pour la première fois, la modulation fine et le contrôle de la quantité efficace de transgène exprimé par la possibilité de moduler le volume du tissu musculaire à transfecter, par exemple avec des sites multiples d'administration, ou encore la possibilité de moduler le nombre, la forme, la surface et la disposition des électrodes. Un élément de contrôle supplémentaire provient de la possibilité de moduler l'efficacité de la transfection par la variation de l'intensité de champ, du nombre de la durée et de la fréquence des impulsions, et évidemment suivant l'état de l'art, la quantité et le volume d'administration des acides nucléiques. On peut ainsi obtenir un niveau de transfection approprié au niveau de production ou de sécrétion désiré. Le procédé permet enfin un surcroît de sécurité par rapport aux méthodes chimiques ou virales de transfert de gènes *in vivo*, pour lesquelles l'atteinte d'organes autres que l'organe cible ne peut pas être totalement exclue et maîtrisée. En effet, le procédé selon l'invention permet le contrôle de la localisation des tissus transfectés (strictement liée au volume de tissu soumis aux impulsions électriques locales) et apporte donc la possibilité d'un retour à la situation initiale par l'ablation totale ou partielle du muscle, rendue possible par le caractère non vital de ce tissu et par ses capacités de régénération. Cette grande souplesse d'utilisation permet d'optimiser le procédé suivant l'espèce animale (applications humaines et vétérinaires), l'âge du sujet, son état physiologique et/ou pathologique.

Le procédé selon l'invention permet, en outre, pour la première fois, de transfecter des acides nucléiques de grande taille contrairement aux méthodes virales qui sont limitées par la taille de la capsid. Cette possibilité est essentielle pour le transfert de gènes de très grande taille comme celui de la dystrophine ou de gènes

avec des introns et/ou des éléments régulateurs de grande taille, ce qui est nécessaire par exemple pour une production physiologiquement régulée d'hormones. Cette possibilité est essentielle pour le transfert d'épisomes ou de chromosomes artificiels de levure ou de minichromosomes.

5

Les exemples qui suivent sont destinés à illustrer de manière non limitative l'invention.

Dans ces exemples, on se réfèrera aux figures suivantes :

- Figure 1 : Effets d'impulsions électriques d'intensité de champ élevé sur la transfection d'ADN plasmidique pXL2774 dans le muscle tibial cranial chez la souris; valeurs moyennes \pm SEM,
- Figure 2 : Effets d'impulsions électriques d'intensité de champ intermédiaire sur la transfection d'ADN plasmidique pXL2774 dans le muscle tibial cranial chez la souris; valeurs moyennes \pm SEM,
- Figure 3 : Effets d'impulsions électriques d'intensité de champ faible et de différentes durées sur la transfection d'ADN plasmidique pXL2774 dans le muscle tibial cranial chez la souris; valeurs moyennes \pm SEM,
- Figure 4 : Effets d'impulsions électriques d'intensité de champ faible et de différentes durées sur la transfection d'ADN plasmidique pXL2774 dans le muscle tibial cranial chez la souris; valeurs moyennes \pm SEM,
- Figure 5 : Efficacité de l'électrotransfection de l'ADN plasmidique pXL2774 dans le muscle tibial cranial de la souris aux intensités de champs électriques faibles : valeurs moyennes \pm SEM.
- Figure 6 : Cinétique d'expression de la luciférase dans le muscle tibial cranial de souris. Administration du plasmide pXL2774 avec électrotransfert (■) et sans électrotransfert (X) ; valeurs moyennes \pm SEM.
- Figure 7 : Niveau d'expression du transgène en fonction la dose d'ADN administrée, avec électrotransfert (●) et sans électrotransfert (□).
- Figure 8 : Effet de différents type d'électrodes sur l'efficacité de l'électrotransfert.
- Figure 9 : Cinétique de la concentration sérique en phosphatase alcaline sécrétée. Administration du plasmide pXL3010 avec électrotransfert (■) et sans électrotransfert (◆) ; valeurs moyennes \pm SEM.

- Figure 10 : Cinétique d'expression du FGF1 dans le muscle avec électrotransfert (barres d'histogramme blanches), et sans électrotransfert (barres d'histogramme noires).
- Figure 11 : cartes des plasmides pXL3179 et pXL3212.
- 5 • Figure 12 : cartes des plasmides pXL3388 et pXL3031.
- Figure 13 : cartes des plasmides pXL3004 et pXL3010.
- Figure 14 : cartes des plasmides pXL3149 et pXL3096.
- Figure 15 : cartes des plasmides pXL3353 et pXL3354.
- Figure 16 : carte du plasmide pXL3348

10

Exemple 1 : expérience effectuée dans les conditions de l'état de la technique antérieure dans laquelle les champs électriques se montrent inhibiteurs de la transfection

15

Les conditions standards d'électroporation, telles que celles utilisées dans l'art antérieur et qui ont été discutées ci-avant, ont été testées et se sont avérées être inefficaces, voire même avoir une action inhibitrice sur le transert d'acides nucléiques (ADN plasmidique) dans le muscle strié.

20

Matériel et Méthodes - Conditions opératoires générales

Dans cet exemple, les produits suivants ont été utilisés :

25 ADN pXL2774 (brevet PCT/FR 96/01414) est un ADN plasmidique comportant le gène rapporteur de la luciférase. Les autres produits sont disponibles auprès de fournisseurs du commerce : Kétamine, Xylazine, Sérum physiologique (NaCl 0,9 %).

30 Un oscilloscope et un générateur d'impulsions électriques (rectangulaires ou carrées) du commerce (Electro-pulsateur PS 15, Jouan, France) ont été utilisés. Les électrodes utilisées sont des électrodes plates en acier inoxydable distantes de 1 à 15 mm.

L'expérience est réalisée chez la souris C57 Bl/6. Les souris provenant de différentes cages sont réparties au hasard avant l'expérience ("randomisation").

Les souris sont anesthésiées par un mélange kétamine, xylazine. La solution de plasmide (30 µl d'une solution à 500 µg/ml de NaCl 0,9%) est injectée longitudinalement à travers la peau dans le muscle tibial cranial des pattes gauche et droite à l'aide d'une seringue hamilton. Les deux électrodes sont enduites d'un gel conducteur et la patte injectée est placée entre les électrodes au contact de celles-ci.

5 Les impulsions électriques sont appliquées perpendiculairement à l'axe du muscle à l'aide d'un générateur d'impulsions carrées, une minute après l'injection. Un oscilloscope permet de contrôler l'intensité en Volts (les valeurs indiquées dans les exemples représentent les valeurs maximales), la durée en millisecondes et la fréquence 10 en hertz des impulsions délivrées, qui est de 1 Hz. 8 impulsions consécutives sont délivrées.

Pour l'évaluation de la transfection du muscle, les souris sont euthanasiées 7 jours après l'administration du plasmide. Les muscles tibial cranial des pattes gauche et droite sont alors prélevés, pesés, mis dans du tampon de lyse et broyés. La suspension 15 obtenue est centrifugée afin d'obtenir un surnageant clair. La mesure de l'activité luciférase est réalisée sur 10 µl de surnageant à l'aide d'un luminomètre du commerce dans lequel le substrat est ajouté automatiquement à la solution. L'intensité de la réaction lumineuse est donnée en RLU (Relative Luminescence Unit) pour un muscle connaissant le volume total de suspension (1.10^6 RLU sont équivalents à 30 pg de luciférase). Chaque condition expérimentale est testée sur 10 points : 5 animaux 20 injectés en bilatéral. Les comparaisons statistiques sont réalisées à l'aide de tests non paramétriques.

25 Résultats et discussion.

Deux figures, dont l'échelle est linéaire ou logarithmique, illustrent les résultats.

Dans cette première expérience on a testé les effets d'un champ électrique de 800 à 1200 Volts/cm qui permet l'électroporation de tumeurs (Mir et al. Eur. J. Cancer 30 27, 68, 1991).

On constate, d'après la figure 1, que, relativement au groupe contrôle, où l'ADN est injecté sans impulsion électrique :

- avec 8 impulsions de 1200 Volts/cm et d'une durée de 0,1 msec, la valeur moyenne de l'activité luciférase est beaucoup plus faible,
- avec des impulsions de 1200 Volts/cm et de 1 msec, 3 animaux sont morts, la valeur moyenne de l'activité luciférase est beaucoup plus faible,

5 • avec des impulsions de 800 Volts/cm et de 1 msec la valeur moyenne de l'activité luciférase est aussi significativement réduite.

La plupart des muscles ayant subi l'action du champ électrique sont visiblement altérés (friables et d'aspect blanchâtre).

10 **Exemple 2 : expérience d'électrotransfert d'acides nucléiques à des champs électriques modérés**

15 Cette expérience est réalisée avec des souris C57 Bl/6. Mis à part l'intensité de champ électrique des impulsions et leur durée, les conditions de réalisation sont celles de l'exemple 1.

20 Les résultats sont montrés à la figure 2. On reproduit le résultat de l'exemple 1, c'est-à-dire l'effet inhibiteur d'une série de 8 impulsions à 800 Volts/cm d'une durée de 1 msec sur l'activité luciférase détectée dans le muscle. Avec un champ de 600 Volts/cm, on observe la même inhibition et la même altération du tissu musculaire.

25 Par contre, de façon remarquable et surprenante, la diminution du voltage permet de ne plus altérer visiblement les muscles, et, de plus, à 400 et 200 Volts/cm le niveau de transfection des muscles est en moyenne supérieur à celui obtenu sur les muscles non soumis à un champ. Il est à noter que, relativement au groupe témoin (non soumis à un champ électrique), la dispersion des valeurs de l'activité luciférase est diminuée à 200 Volts/cm (SEM = 20,59% de la valeur moyenne contre 43,32% en l'absence de champ électrique (figure 2A)).

30 **Exemple 3 : expérience d'électrotransfert d'acides nucléiques avec des impulsions de faible intensité de champ montrant une très forte stimulation de l'expression du transgène**

Cette expérience est réalisée avec des souris C57 Bl/6. Mis à part l'intensité de champ électrique des impulsions et leur durée, et le fait que les impulsions sont délivrées 25 secondes après l'injection de l'ADN, les conditions de réalisation sont celles des exemples précédents.

5 Les résultats sont montrés à la figure 3. La valeur moyenne de l'expression du transgène luciférase est nettement augmentée avec une durée d'impulsion de 20 msec à 100 Volts/cm, et à partir d'une durée d'impulsion de 5 msec à 200 Volts/cm.

Cette expérience montre aussi clairement que la valeur moyenne de l'activité luciférase obtenue par électrotransfection de l'ADN dans le muscle est une fonction de 10 la durée des impulsions électriques, lorsqu'on emploie des voltages de 200 et 100 Volts/cm. On note aussi que la dispersion des valeurs est notablement réduite pour les groupes de muscles électrotransfектés (figure 3A). En l'absence d'impulsions électriques (contrôle), la SEM représente 77,43% de la valeur moyenne alors que la SEM relative de la moyenne est réduite à 14% (200 Volts/cm, 5 msec), 41,27% (200 15 Volts/cm, 20 msec) et entre 30% et 48% pour l'électrotransfert à 100 Volts/cm de champ électrique.

Dans la meilleure condition de cette expérience, on améliore par un facteur de 20 89,7 l'expression du transgène par rapport au contrôle injecté en l'absence d'impulsions électriques.

20

Exemple 4 : expérience d'électrotransfert d'acides nucléiques dans le muscle à 200 Volts/cm montrant une augmentation de l'expression du transgène d'un facteur supérieur à 200

25

Cette expérience est effectuée chez les souris DBA 2, avec des impulsions électriques d'une intensité de champ de 200 Volts/cm et de durée variable, les autres conditions de cette expérience étant celles de l'exemple 3.

Cet exemple confirme qu'à 200 Volts/cm la transfection de l'activité luciférase 30 est augmentée à partir d'une durée d'impulsion de 5 msec puis continue à croître pour des durées plus longues (figures 4 et 5). Là encore, on observe avec l'électrotransfection une réduction de la variabilité inter-individuelle indiquée par la SEM par rapport au contrôle non électrotransfектé (la valeur relative de la SEM est

égale à 35% pour le contrôle et 25, 22, 16, 18, 16 et 26% pour des séries d'impulsions de 1, 5, 10, 15, 20 et 24 msec respectivement).

Dans la meilleure condition de cette expérience, on améliore par un facteur de 205 l'expression du transgène par rapport au contrôle injecté en l'absence 5 d'impulsions électriques. Il apparaît ainsi que la variation de la durée de chaque impulsion délivrée est un moyen de moduler l'efficacité du transfert d'acides nucléiques et d'ajuster le niveau d'expression du transgène.

10

Exemple 5 : efficacité de l'électrotransfert d'acides nucléiques en fonction du produit « nombre des impulsions x intensité du champ x durée de chaque impulsion »

15

La figure 5 exemplifie l'importance du paramètre correspondant au produit « nombre des impulsions x intensité du champ x durée de chaque impulsion ». Ce paramètre correspond en fait à l'intégrale en fonction du temps de la fonction qui décrit la variation du champ électrique.

20

La représentation en figure 5 des résultats obtenus au cours des expériences 2, 3 et 4 avec des intensités de champ électrique de 200 V/cm, 100 V/cm ou en absence des champs électriques montre que l'efficacité de transfection augmente en fonction du produit de la durée totale d'exposition au champ électrique par l'intensité de champ. Un effet de stimulation est obtenu pour une valeur supérieure à 1 kVxmsec/cm du produit « champ électrique x durée totale des impulsions ». Selon un mode préféré, 25 une stimulation est obtenue pour une valeur supérieure ou égale à 5 kVxmsec/cm du produit « champ électrique x durée totale des impulsions ».

Exemple 6 : effet de l'augmentation de la durée des impulsions électriques.

30

Cet exemple illustre que l'on peut augmenter la durée unitaire des impulsions bien au delà des valeurs testées dans l'exemple 4.

Cette expérience est réalisée avec des souris C57Bl/6. Le plasmide utilisé est le plasmide pXL 2774, la quantité d'ADN administrée est de 15 µg. L'électropulsateur utilisé pour délivrer les impulsions électrique d'une durée supérieure à 20 msec est un électropulsateur du commerce (Genetronics, modèle T 820, USA, San Diego, CA).

5 Les impulsions électriques sont de nombre et de durée variable mais d'une intensité de champ constante de 200 Volts/cm ; les autres conditions de cette expérience sont celles décrites dans l'exemple 1. Les résultats sont présentés dans le tableau 1.

durée Impulsion (msec)	0	1	5	10	20	30	40	50	60	80
Expérience A 8 impulsions	11 ± 5	39 ± 6	211 ± 26	288 ± 46	1158 ± 238	1487 ± 421	2386 ± 278			
Expérience A 4 impulsions	11 ± 5	26,8 ± 6	123 ± 17	246 ± 32	575 ± 88	704 ± 130		3440 ± 1077		
Expérience B 4 impulsions	15 ± 8						2885 ± 644		2626 ± 441	1258 ± 309

10 Tableau 1 : valeurs moyennes +/- SEM de l'activité luciférase en millions de RLU par muscle . N = 10 pour chaque groupe. Conditions électrotransfert : intensité de champ 200 V/cm, 8 ou 4 impulsions (durée unitaire variable), fréquence 1 Hz.

15 On constate une augmentation de l'expression du transgène avec l'allongement de la durée unitaire des impulsions (au moins jusqu'à 40 msec pour une série de 8 impulsions et au moins jusqu'à 50 msec pour une série de 4 impulsions d'une intensité de 200 Volts/cm). Cet exemple montre que l'optimum de la durée des impulsions dépend du nombre d'impulsions utilisées et que la durée unitaire des impulsions peut atteindre au moins 80 msec, cette valeur de durée n'étant pas limitative.

Exemple 7 : efficacité de l'électrotransfert en fonction du nombre d'impulsions électriques

Cette exemple met en évidence l'effet de l'augmentation du nombre d'impulsions électriques sur l'efficacité du transfert d'acides nucléiques.

5 Cette expérience est réalisée avec des souris C57B1/6. Le plasmide utilisé est le plasmide pXL 2774, la quantité d'ADN administrée est de 15 µg. Les impulsions électriques sont variables en nombre. La durée de chaque impulsion est de 20 msec. L'intensité de champ est de 200 Volts/cm. Les autres conditions de cette expérience sont celles décrites dans l'exemple 1. Les résultats sont présentés dans le tableau 2.

10

Nombre impulsions	0	1	2	4	6	8	12	16
RLU total	70 ± 56	147 ± 26	281 ± 46	439 ± 50	678 ± 129	819 ± 73	929 ± 169	890 ± 137

Tableau 2 : valeurs moyennes +/- SEM de l'activité luciférase en millions RLU par muscle. N = 10 par groupe. Conditions : intensité de champ 200 V/cm, nombre variable d'impulsions de 20 msec, fréquence 1 Hz.

15 On observe que l'expression de la luciférase augmente de manière très importante dès l'application d'une seule impulsion, et qu'elle continue d'augmenter en fonction du nombre d'impulsions. Il apparaît ainsi que la variation du nombre d'impulsions délivrées est un moyen de moduler l'efficacité du transfert d'acides nucléiques et d'ajuster le niveau d'expression du transgène.

20 On confirme également une diminution de la variabilité de la réponse mise en évidence par la diminution de la valeur de la SEM par rapport à la moyenne pour tous les groupes soumis à l'électrotransfert.

Exemple 8 : effet de l'augmentation de la fréquence des impulsions électriques.

Cet exemple montre que l'augmentation de la fréquence des impulsions permet de manière inattendue d'améliorer l'efficacité de la transfection. D'autre part et dans 5 une perspective clinique, l'augmentation de la fréquence doit améliorer le confort du patient en diminuant la durée totale du traitement.

Cette expérience est réalisée avec des souris C57B1/6. Le plasmide utilisé est le plasmide pXL 2774, la quantité d'ADN administrée est de 15 µg. La fréquence des impulsions électriques est variable (de 0,1 à 4 Hertz). La durée de chaque impulsion 10 est de 20 msec, l'intensité de champ est de 200 Volts/cm, les autres conditions de cette expérience sont celles décrites dans l'exemple 1. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

Fréquence Hertz	0	0,1	0,2	0,5	1	2	3	4
Expérience A 8 impulsions	5 ± 2	54 ± 13	95 ± 16	405 ± 60	996 ± 156	1528 ± 257		
Expérience A 4 impulsions		114 ± 14	163 ± 24	175 ± 26	337 ± 53	587 ± 90		
Expérience B 8 impulsions	21 ± 14				1294 ± 189	2141 ± 387	3634 ± 868	2819 ± 493
Expérience B 4 impulsions					1451 ± 228	1572 ± 320	1222 ± 126	2474 ± 646

15 Tableau 3 : valeurs moyennes +/- SEM de l'activité luciférase en millions de RLU par muscle. N = 10 pour chaque groupe. Conditions : intensité de champ 200 V/cm, 8 ou 4 impulsions de 20 msec., fréquence variable.

Les résultats obtenus dans l'expérience « A » , tableau 3 montrent que les fréquences plus élevées (≥ 1 Hz) sont plus efficaces que les fréquences faibles qui correspondent à une durée plus longue entre deux impulsions consécutives (10 secondes à 0.1 Hertz). L'efficacité de la transfection augmente avec la fréquence sur la 5 plage de valeurs testées de 0.1 à 4 Hertz pour 4 impulsions et de 0.1 à 3 Hertz pour 8 impulsions.

Exemple 9 : effet de l'application d'un champ électrique variant selon une exponentielle décroissante en fonction du temps.

10 Cette exemple met en évidence l'effet de l'application d'un champ électrique variant selon une exponentielle décroissante sur l'efficacité du transfert d'acides nucléiques.

Cette expérience est réalisée avec des souris C57B1/6.

15 Le plasmide utilisé est le plasmide pXL 3031. Le plasmide pXL3031 (Figure 12) est un vecteur dérivé du plasmide pXL2774 (WO97/10343) dans lequel le gène luc+ codant pour la luciférase de Photinus pyralis modifiée (cytoplasmique) provenant de pGL3basic (Genbank: CVU47295) a été introduit sous contrôle du promoteur provenant de la région précoce du cytomegalovirus humain (hCMV IE, Genbank HS5IEE) et du signal de poly-adénylation de la région tardive du virus SV40 20 (Genbank SV4CG). La quantité d'ADN administrée est de 10 µg.

25 Le générateur d'impulsions électriques utilisé permet de délivrer des impulsions d'une intensité de champ électrique variant selon une exponentielle décroissante en fonction du temps (électropulsateur Equibio, modèle easyjectT plus, Kent UK). Le voltage imposé est le voltage au pic de l'exponentielle. Le deuxième paramètre ajustable est la capacitance (μ Farads) qui permet de faire varier la quantité d'énergie délivrée et la constante de temps de l'exponentielle. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.

	Capa μ F 150	Capa μ F 300	Capa μ F 450	Capa μ F 600	Capa μ F 1200	Capa μ F 2400	Capa μ F 3000
40 V/cm						1,23	11
100 V/cm				16,5	2,8	6,5	23,9
150 V/cm				1,8	3,5	6,1	
200 V/cm		5,1		15,8	18,8	121,5	189,7
300 V/cm	32,1	90,5	48,7	760,4	56,2		
400 V/cm		795					
600 V/cm	62						
800 V/cm	3,1	1,1					

5 Tableau 4 : facteur d'augmentation de l'expression (activité luciférase) obtenu par application d'une impulsion à décroissance exponentielle. Le facteur d'augmentation est calculé par référence à l'activité luciférase obtenue avec l'administration du plasmide pXL3031 sans électrotransfert. (valeurs moyennes du facteur d'augmentation, N = 4 à 6 par condition).

10 A titre comparatif, le facteur d'augmentation de l'expression obtenu pour le transfert de pXL3031 en présence d'un champ électrique avec des impulsions de formes carrées (intensité de champ de 200 V/cm, 8 impulsions de 20 msec, à une fréquence de 1 Hertz) était de 44 dans la même expérience.

15 Ces résultats montrent que l'on peut utiliser des impulsions électriques de forme carrée ou d'une intensité décroissant de manière exponentielle en fonction du temps. De plus, dans ce dernier cas, une augmentation importante de l'expression peut être obtenue pour une valeur de champ faible et une capacitance élevée (e.g. 200 V/cm, capacitance 3000 μ Farad) ou une valeur de champ élevée et une capacitance faible (e.g. 400 V/cm, capacitance 300 μ Farad).

Exemple 10 : effet de la combinaison d'une impulsion brève de voltage élevé et de plusieurs impulsions longues de voltage faible.

5 Cet exemple montre que le champ électrique délivré peut être une combinaison d'au moins un champ compris entre 500 et 800 Volts/cm pendant une courte durée, par exemple 50 ou 100 μ sec, et d'au moins un champ faible (< 100 Volts/cm) pendant une durée plus longue, par exemple ≥ 1 msec et jusqu'à 90 msec dans cette expérience.

10 Les valeurs de champ électrique faible sont ici de 80 V/cm appliquées en 4 impulsions d'une durée de 90 msec avec une fréquence de 1 Hertz. Pour cette expérience deux électropulsateurs sont utilisés. Les impulsions électriques sont appliquées par l'un puis l'autre appareil, le changement s'effectuant en moins d'une seconde à l'aide d'une commande manuelle.

15 Le plasmide utilisé est le plasmide pXL3031. La quantité d'ADN administrée est de 3 μ g. Les valeurs de champ électrique sont indiquées dans le tableau 5 ; les autres conditions de cette expérience sont celles décrites dans l'exemple 1.

Conditions d'application du champ électrique	Expérience 1 (3 μ g pXL3031)	Expérience 2 (3 μ g pXL3031)
Contrôle (absence de champ électrique)	320 +/- 126	75 +/- 27
A1 : 500 V/cm , 1 x 0,1 msec	-	169 +/- 63
A3 : 800 V/cm , 1 x 0,1 msec	416 +/- 143	272 +/- 84
B : 80 V/cm , 4 x 90 msec	1282 +/- 203	362,21 +/- 85,17
Conditions A1 puis B	-	1479 +/- 276
Conditions A3 puis B	3991 +/- 418	1426 +/- 209
Conditions B puis A3	-	347 +/- 66

Tableau 5 : valeurs moyenne +/- SEM de l'activité luciférase en millions de RLU par muscle. N = 10 muscles par groupe.

Le tableau 5, résumant les résultats obtenus pour deux séries d'expériences, montre qu'une brève impulsion de voltage élevé ou que quatre impulsions successives longues et de faible voltage améliorent peu la transfection relativement au groupe contrôle ayant reçu une injection de pXL3031 mais non soumis à un champ électrique. Il en est de même lorsque les impulsions de champ faible sont appliquées avant l'impulsion de champ élevé.

Par contre, dans les deux séries d'expériences, la combinaison d'une brève impulsion de haut voltage suivie de quatre impulsions successives longues et de faible voltage augmente très nettement l'efficacité du transfert de l'ADN.

Les résultats obtenus dans les exemples 1 et 2 ont montré que 8 impulsions de 600, 800 ou 1200 volts d'une durée unitaire de 1 msec à 1 Hz étaient lésionnelles et inhibaient la transfection. Les résultats obtenus dans l'exemple 10 montrent que, dans des conditions particulières, il est possible d'utiliser des intensités de champ de voltage élevées de façon non lésionnelle, en effet d'un point de vu macroscopique les muscles ne sont jamais visiblement altérés. L'utilisation de champs électriques élevés de durée brève combinés à des champs faibles de durée plus longue apparaît comme un moyen supplémentaire de moduler l'efficacité du transfert de l'ADN.

Exemple 11 : électrotransfert avec des plasmides de tailles différentes, des gènes sous contrôle de différents promoteurs ou avec des sites d'adressage variable de la protéine exprimée par le transgène.

25

11. a - électrotransfert avec des plasmides de tailles différentes

Des plasmides de taille différente (2.8 Kb, 3.8 Kb, 8.6 Kb, 20 Kb, et 52,5 Kb) comprenant le gène codant pour la luciférase ont été testés. La quantité de plasmide

administrée est de 10 µg par muscle. Un champ électrique d'une intensité de 200 V/cm en 8 impulsions de 20 msec à 2 Hz est appliqué , les autres conditions de cette expérience étant celles décrites dans l'exemple 1.

On observe une augmentation de l'expression du transgène d'environ 50 fois
5 avec les plasmides de 2,8 Kb et 3,8 Kb, d'environ 80 fois avec le plasmide de 8,6 Kb et de 3 à 6 fois avec les plasmides de 20 et 52,6 Kb.

Cet exemple démontre ainsi la possibilité de transférer des plasmides de taille importante, allant jusqu'à 20 Kb et au delà.

11. b : contrôle du signal de luminescence en absence de gène codant pour la luciférase.

A titre de contrôle, et pour exclure la possibilité que les signaux de luminescence observés pour le dosage de l'activité luciférase soient dûs à des radicaux produits dans le tissu suite au traitement électrique, l'activité luciférase a été testée sur des muscles traités avec un plasmide ne codant pas pour la luciférase et soumis à un
15 champ électrique.

Electrotransfert	-	+
Plasmide pXL 3004 (15 µg) codant pour la β-galactosidase	0,016 +/- 0,005 (n=6)	0,015 +/- 0,006 (n=6)
Plasmide pXL 2774 (15µg) codant pour la luciférase	7,33 +/- 3,53 (n=10)	491,71 +/- 122,28 (n=10)

Tableau 6 : activité luciférase dans des muscles injectés avec différents plasmides, avec ou sans application d'un champ électrique. Conditions : 200 V/cm, 8 impulsions de 20 msec, fréquence 1 Hz. Valeurs moyennes +/- SEM de l'activité
20 luciférase en millions de RLU par muscle.

Les résultats montrent que l'activité basale de la luciférase dans des muscles injectés avec un plasmide ne codant pas pour la luciférase est tout à fait négligeable.

11. c - électrotransfert de gènes sous contrôle de différents promoteurs.

5 L'influence de différents promoteurs a été testée sur le niveau d'expression des gènes transférés, avec et sans, application du champ électrique.

10 La quantité de plasmide injecté par muscle est de 2 µg. Le champ électrique appliqué est de 200 V/cm en 8 impulsions de 20 msec à 1 Hz , les autres conditions de cette expérience sont celles décrites dans l'exemple 1. Les résultats sont présentés dans le tableau 7. Le plasmide testé est le plasmide pXL3031 pour la construction CMV-LUC. La construction PGK correspond à la substitution du promoteur CMV par le promoteur PGK dans le pXL3031.

Promoteur	PGK		CMV	
Electrotransfert	-	+	-	+
RLU	8 ± 2,8	1070 ± 327	157 ± 83	20350 ± 1112
Facteur d'amplification	x 133,7		x 129,3	

15 Tableau 7 : valeurs moyennes +/- SEM de l'activité luciférase en millions de RLU par muscle.

20 Ces résultats montrent que, lorsque l'ADN est transféré en présence d'un champ électrique, le facteur d'augmentation de l'expression du transgène est comparable quelle que soit l'origine ou la force du promoteur.

11. d - électrotransfert de gène avec différents sites d'adressage de la protéine exprimée par le transgène.

Cet exemple illustre le transfert de gène codant pour des protéines ayant différentes localisations cellulaires. Le plasmide pXL3031 code pour une luciférase synthétisée dans le cytosol et le plasmide pXL2774 code pour une luciférase adressée dans les peroxysomes.

5 La quantité de plasmide injectée par muscle est de 10 µg. Le champ électrique appliqué est de 200 V/cm en 8 impulsions de 20 msec à 1 Hz , les autres conditions de cette expérience sont celles décrites dans l'exemple 1. Les résultats sont présentés dans le tableau 8.

pXL 2774		pXL 3031	
Electrotransfert -	Electrotransfert +	Electrotransfert -	Electrotransfert +
11 ± 5	1158 ± 238	839 ± 281	111524 ± 16862

10 Tableau 8 : valeurs moyennes +/- SEM de l'activité luciférase en millions de RLU.

15 Ces résultats mettent en évidence que le procédé selon l'invention s'applique pour le transfert de gènes codant pour des protéines de localisations cellulaires différentes, et notamment pour des protéines péricaryosomales ou des protéines cytosoliques.

Exemple 12 : analyse cinétique et histologique de l'expression du transgène.

20 12. a - cinétique d'expression du transgène

Cet exemple montre que le transfert d'acides nucléiques en présence d'un champ électrique dans les conditions selon l'invention permet d'obtenir l'expression d'un transgène à un niveau élevé et stable pendant une durée d'au moins 4 mois.

Cette expérience est réalisée avec des souris C57B1/6. Le plasmide utilisé est le plasmide pXL 2774, la quantité d'ADN administrée est de 15 µg. L'injection d'ADN est suivie, ou non (groupe contrôle), de l'application d'un champ électrique dans les conditions suivantes : intensité 200 V/cm , 8 impulsions de 20 msec, fréquence 1 Hz.

5 Les autres conditions de cette expérience sont celles décrites dans l'exemple 1. L'activité luciférase est déterminée sur des groupes de 10 souris sacrifiées à différents temps. Les résultats sont présentés dans la figure 6.

On observe, pour le groupe contrôle, que l'expression de la luciférase est détectable dès la 3 ème heure après l'injection du plasmide et augmente jusqu'au 3 ème jour (J3) puis décroît de manière notable après 35 jours.

On constate, pour le groupe soumis aux impulsions électriques, que l'expression du transgène se maintient à un niveau très nettement supérieur à celui du groupe contrôle. De plus, et de manière remarquable, on observe que ce niveau d'expression reste élevé et constant au delà de 35 jours et au moins jusqu'à 120 jours.

15 Ce niveau d'expression élevé et durable du transgène est un résultat particulièrement avantageux dans la perspective de traitements cliniques à long terme avec des gènes thérapeutiques.

12. b - analyse histologique

Une étude histologique a été conduite dans les mêmes conditions mais en administrant le plasmide pCOR CMV-lacZ (pXL3004) codant pour la β-galactosidase à localisation nucléaire.

Le plasmide pXL3004 (Figure 13) est un vecteur dérivé du plasmide pXL2774 (WO97/10343) dans lequel le gène lacZ additionné d'une séquence de localisation nucléaire (nls) (Nouvel et al., 1994, *Virology* 204:180-189)) a été introduit sous contrôle du promoteur CMV du plasmide pCDNA3 (Invitrogen, Pays-Bas) et du signal de poly-adénylation de la région précoce du virus SV40 (Genbank SV4CG).

Les animaux sont sacrifiés sept jours après administration du plasmide. L'analyse histologique permet de détecter les cellules exprimant la β-galactosidase et dont le noyau est situé dans le plan de coupe (histochimie Xgal).

Le nombre de fibres musculaires présentant des noyaux positifs au niveau des coupes examinées est en moyenne de 76 dans le groupe (n=8) ayant reçu le plasmide pXL3004 puis soumis aux impulsions électriques contre une moyenne de 8.5 dans le groupe contrôle (n=8) (animaux ayant reçu le plasmide pXL3004 mais n'ayant pas été 5 soumis aux impulsions électriques).

On observe que le nombre de fibres musculaires exprimant le transgène est en moyenne neuf fois plus élevé par rapport au groupe contrôle. La plupart de ces fibres musculaires sont quiescentes avec des noyaux situés en périphérie. De très rares fibres musculaires centronucléées expriment la β -galactosidase. On observe également que, le 10 long du trajet d'injection du plasmide, la densité de fibres musculaires positives par unité de surface est plus importante dans le groupe traité par électrotransfert par rapport au groupe contrôle.

L'ensemble de ces résultats montrent que, relativement à des muscles non soumis au champ électrique, l'électrotransfert permet une très nette augmentation du 15 nombre de fibres musculaires exprimant le transgène ainsi qu'une très nette augmentation de la surface de la zone exprimant le transgène. Il est observé également que l'application du champ électrique n'entraîne pas de réaction inflammatoire notable.

Exemple 13 : Effet du moment d'injection de l'acide nucléique par rapport à l'application du champ électrique.

Cet exemple illustre le fait que l'acide nucléique peut être administré au moins 30 minutes, et même au moins une heure, avant l'application du champ électrique.

Cette expérience est réalisée avec des souris C57Bl/6. Le plasmide utilisé est le plasmide pXL 2774. La quantité d'ADN administrée est de 15 μ g ou 1,5 μ g. 25 L'injection d'ADN est suivie, ou précédée, de l'application d'un champ électrique dans les conditions suivantes : intensité 200 V/cm , 8 impulsions de 20 msec, fréquence 1 Hz. Les autres conditions de cette expérience sont celles décrites dans l'exemple 1. Un groupe contrôle est constitué d'animaux ayant reçu une injection du plasmide mais n'ayant pas été soumis aux impulsions électriques. Les résultats sont présentés dans le 30 tableau 9

Tableau 9 A : Injection ADN en absence de champ électrique

	<u>Exp 1</u> pXL2774 (15 µg)	<u>Exp 2</u> pXL 2774 15 µg)	<u>Exp 3</u> pXL 2774 (1,5 µg)	<u>Exp 4</u> pXL 2774 (15 µg)	<u>Exp 5</u> pXL 2774 (1,5 µg)
Contrôle	7 ± 4	8 ± 6	0,4 ± 0,2	22 ± 15	1 ± 1

Tableau 9 B : Injection ADN avant application du champ électrique

<u>temps</u>	<u>Exp 1</u>	<u>Exp 2</u>	<u>Exp 3</u>	<u>Exp 4</u>	<u>Exp 5</u>
- 120 min				20 ± 5	2 ± 1
- 60 min				106 ± 22	10 ± 3
- 30 min	303 ± 36	237 ± 61	7 ± 3	184 ± 22	15 ± 4
- 5 min	410 ± 7				
- 60 sec	253 ± 51				
- 20 sec	492 ± 122	201 ± 43	9 ± 3	123 ± 23	12 ± 2

Tableau 9 C : Injection ADN après application du champ électrique

<u>temps</u>	<u>Exp 1</u>	<u>Exp 2</u>	<u>Exp 3</u>	<u>Exp 4</u>	<u>Exp 5</u>
+ 10 sec				7 ± 7	
+ 20 sec	11 ± 6	0,4 ± 0,1			
+ 60 sec	8 ± 7			17 ± 15	

Tableau 9: valeurs moyennes +/- SEM de l'activité luciférase en millions de RLU par muscle. N = 10 muscles par groupe.

5

La présence de l'ADN au moment de l'application du champ électrique est une condition de l'efficacité de l'électrotransfection. De façon remarquable, il est observé

que l'injection du plasmide peut être réalisée au moins 30 minute et même 1 heure (expériences 4 et 5) avant l'application du champ électrique et ce, sans modification notable du niveau d'expression. Un résultat similaire est obtenu aussi bien avec une dose de 15 µg de plasmide par muscle qu'avec une dose 10 fois plus faible de 1,5
5 µg.

Ces observations permettent notamment d'envisager de multiples injections à des temps variables du même plasmide, ou de différents plasmides, dans le muscle préalablement à l'application du champ électrique. Il est également possible de faire de multiples injections sur une zone étendue du muscle puis d'appliquer une série
10 15 d'impulsions électriques sur l'ensemble du territoire injecté à traiter.

Exemple 14 : Etude statistique sur la relation entre la dose d'ADN injecté et le niveau d'expression.

L'étude statistique présentée dans cet exemple permet de comparer la relation effet/dose d'un transgène administré en présence, ou en absence, d'un champ électrique. Cette étude confirme également que le procédé selon l'invention réduit considérablement la variabilité d'expression du transgène.
15

Des souris C57Bl6 âgées de 5 semaines ont reçu une injection de plasmide pXL3031 dans le muscle tibial cranial et de manière bilatérale. Les doses de plasmide varient de 0,25 à 32µg d'ADN. Chaque dose est testée sur 10 animaux. Immédiatement après l'injection du plasmide, on soumet l'une des deux pattes à un champ de 250V/cm, avec 4 impulsions de 20ms et une fréquence de 1 Hz.
20

Les animaux sont sacrifiés 5 jours après le traitement et l'expression du transgène est recherchée dans l'extrait tissulaire de chaque muscle. Les résultats sont
25 présentés dans la figure 7.

La comparaison de l'évolution des variances en fonction de celle des moyennes pour chaque série de 10 répétitions montre clairement que la distribution de l'expression du transgène est log-normale. L'analyse graphique des résultats de la

figure 7, confirmée par le calcul, montre que l'expression varie linéairement avec le logarithme de la dose d'ADN injecté.

Le test de Cochran montre qu'il existe une homogénéité des variances pour chaque régression (avec et sans électrotransfert) ce qui permet d'utiliser les variances résiduelles pour effectuer l'ensemble des calculs.

Un test d'écart à la linéarité est non significatif au risque 5% dans le cas où il y a eu électrotransfert, par contre il existe un écart à la linéarité très significatif ($p < 0,01$), ce qui traduit une importante hétérogénéité des réponses en l'absence d'électrotransfert. La variance résiduelle est 5 fois plus faible avec l'électrotransfert.

Compte tenu des valeurs estimées des variances résiduelles, il est possible d'utiliser 5 fois moins d'animaux pour obtenir la même puissance dans un test de comparaison d'efficacité de transfection, selon que l'on applique ou non l'électrotransfert. Ainsi pour mettre en évidence une différence d'expression d'un facteur 2, 5 ou 10, avec un intervalle de confiance $P=95\%$, il faudra respectivement 33, 8 ou 5 animaux si le transgène est administré par électrotransfert et 165, 40 ou 25 animaux en absence d'électrotransfert. Un tableau est présenté ci-dessous résumant ce type de calcul dans le cas où l'électrotransfert est utilisé.

Rapport d'efficacité ou d'expression	$P = 95\%$	$P = 90\%$	$P = 85\%$	$P = 75\%$
2	33	28	24	19
5	8	7	6	6
10	5	5	4	4

Ainsi la diminution de la variabilité interindividuelle obtenue avec l'électrotransfert permet d'effectuer des études analytiques précises sur la comparaison de l'expression de différents gènes. Elle autorise également une meilleure définition des doses de traitement et doit prévenir le risque lié au dépassement des doses acceptables dans la fenêtre thérapeutique.

Le test de comparaison des pentes obtenues pour chaque régression est non significatif. On peut donc considérer au risque de 5% qu'il y a parallélisme des deux régressions.

Le calcul de la puissance relative montre que pour atteindre un niveau
5 d'expression comparable à celui obtenu en présence d'électrotransfert il faut, en absence d'électrotransfert, environ 250 fois plus d'ADN injecté par muscle (243 +/- 85 ; intervalle de confiance P = 95%).

Le calcul de la puissance relative montre corrélativement que, pour une quantité d'ADN donnée, le niveau d'expression est environ 500 fois plus élevé en
10 présence d'électrotransfert par comparaison au niveau d'expression obtenu en l'absence d'électrotransfert.

Exemple 15 : comparaison de différents types d'électrodes.

Cet exemple a pour but de comparer l'effet de deux types d'électrodes,
15 électrodes plaques et électrodes aiguilles, sur l'efficacité du transfert d'acides nucléiques. Les électrodes aiguilles ont également été testées selon différentes orientations d'implantation.

La plasmide pXL 2774 (150 µg) est injecté dans le muscle triceps chez le rat.
Les électrodes plaques sont placées comme indiqué dans l'exemple 1. La distance
20 inter-électrode pour les électrodes plaques est de 1,2 cm. Pour les électrodes aiguilles, la distance inter-électrodes est de 0,9 cm. Les électrodes aiguille sont enfoncées dans le tissu musculaire sur une longueur équivalente, soit perpendiculairement, soit parallèlement à l'axe des fibres, de part et d'autre du site d'injection. Quel que soit le type d'électrodes, ou leur orientation, les conditions d'application du champ électrique
25 sont les suivantes : intensité 200 V/cm , 8 impulsions de 20 msec à 2 Hz. Les résultats sont présentés dans la figure 8.

Les résultats obtenus montrent que l'application du champ électrique à l'aide de deux aiguilles parallèles implantées dans le muscle donne des résultats comparables à ce qui est obtenu avec des électrodes plaques mises au contact de la peau entourant

le muscle. Il est également montré que l'efficacité de l'électrotransfert est indépendante de la direction d'implantation des électrodes aiguilles relativement à l'axe des fibres musculaires.

Cet exemple montre que le procédé selon l'invention permet l'électrotransfert 5 d'acides nucléiques à l'aide d'électrodes externes ou invasives et ce, quelle que soit leur orientation. L'utilisation des électrodes aiguilles est particulièrement avantageuse pour assurer le transfert d'acides nucléiques dans les muscles de grande taille tout en conservant des impulsions électriques de voltage modéré (par exemple 100 V avec un espacement de 0,5 cm pour délivrer un champ électrique de 200 V/cm)

10

Exemple 16 : efficacité de l'électrotransfert sur différents muscles de la souris, du rat, du lapin et du singe.

Cet exemple illustre que l'électrotransfert d'acides nucléiques est applicable à 15 différents types de muscles, dans différentes espèces de mammifères (souris, lapin, rat et singe).

Les conditions d'application du champ électrique sont définies dans le tableau 10 A en regard de chaque espèce. Les résultats sont présentés dans le tableau 10 A.

Espèce	plasmide	impulsions électriques	Muscle Tibial cranial	Muscle Gastro-némien	Muscle Rectus femoris	Muscle Triceps brachii	Muscle Quadriceps
Souris	10 µg pXL3031	8 x 200 V/cm 20 msec, 2 Hz	x 28	x 196	x 342	x 1121	
Rat	150 µg pXL3031	8 x 200 V/cm 20 msec, 2 Hz	x 31			x 160	x 13,2
Lapin	200 µg pXL2774	4 x 200 V/cm 20 msec, 1 Hz	x 25417			x 724	x 3595

Tableau 10 A : facteur d'augmentation de l'expression de la luciférase obtenu avec l'électrotransfert. Ce facteur est calculé par référence à l'activité luciférase obtenue pour l'injection du plasmide pXL3031 ou pXL2774 sans électrotransfert. Moyennes sur 10 muscles par groupe. L'activité luciférase est dosée 7 jours après 5 l'administration du plasmide.

L'électrotransfert a également été testé chez le singe (*Macaca fascicularis*). Le plasmide utilisé est le plasmide pXL3179 comprenant le gène codant pour le facteur de croissance de fibroblastes 1 (FGF1 ou aFGF).

10 Le plasmide pXL3179 (Figure 11) est un vecteur dérivé du plasmide pXL2774 (WO97/10343) dans lequel le gène codant pour une fusion entre le peptide signal de l'interféron de fibroblastes humain et l'ADNc du FGF1 (Fibroblast Growth Factor1) (sp-FGF1, Jouanneau et al., 1991 PNAS 88:2893-2897) a été introduit sous contrôle du promoteur provenant de la région précoce du cytomegalovirus humain (hCMV IE) 15 et du signal de poly-adénylation de la région tardive du virus SV40 (Genbank SV4CG).

La présence de FGF1 est déterminée par immuno-histochimie. Les valeurs indiquent le nombre de coupes positives 3 jours après injection intra musculaire de 500 µg du plasmide pXL3179. Les conditions d'application du champ électrique sont les suivantes : intensité du champ électrique 200 V/cm , 8 impulsions de 20 msec à 1 Hz. 20 Les résultats sont présentés dans le tableau ci dessous.

Muscle	Electrotransfert	
	-	+
Triceps	0	0
Tibial cranial	0	30
Biceps	0	4
Quadriceps	0	30

Tableau 10 B : révélation par immuno-histochimie de l'expression de FGF1 25 dans différents muscles de singe (*Macaca fascicularis*). Les valeurs indiquent le

nombre de coupes positives 3 jours après injection intra musculaire de 500 µg du plasmide pXL3179 codant pour FGF1 avec ou sans électrotransfert.

Ces résultats démontrent que l'électrotransfert augmente de manière remarquable l'expression d'un transgène, dans différents types de muscles, dans 5 différentes espèces de mammifères.

Exemple 17 : efficacité de l'électrotransfert sur le muscle du diaphragme de rat

La possibilité d'exprimer de façon durable et stable des gènes d'intérêt thérapeutique directement au niveau du diaphragme est une approche thérapeutique particulièrement intéressante dans le cadre du traitement de certaines maladies dégénératives qui affectent le fonctionnement de ce muscle, telle que notamment la myopathie de Duchenne.

Les rats sont anesthésiés avec un mélange largactyl, kétamine (1 mg/kg largactyl, 150 mg/kg ketamine). Dans ces expériences le diaphragme est rendu accessible par une incision le long du sternum. L'injection est réalisée dans l'hémodiaphragme (50 µg de plasmide pXL 2774 dans 50 µl de NaCl 20 mM et glucose 5 %). Les électrodes plaques sont ensuite placées de part et d'autre du plan du diaphragme le long du trajet d'injection (distance inter électrodes = 1 mm). Les 15 conditions d'électrotransfert sont les suivantes : intensité du champ 160 V/cm ou 300 V/cm, 8 impulsions de 20 msec, fréquence 1 hertz. Le champ électrique est appliqué 20 moins d'une minute après l'injection. L'animal est ensuite recousu.

V/cm	0	160	300
RLU total	48 ± 33	920 ± 474	51 ± 29

25 Tableau 11 : valeurs moyennes +/- SEM de l'activité luciférase en millions de RLU par muscle. N = 12 pour chaque groupe.

Cette exemple montre une amélioration significative de l'expression du transgène dans le diaphragme après application de 8 impulsions de 20 msec d'une intensité de champ de 160 V/cm ($p < 0,003$ avec le test non paramétrique de Mann-Whitney).

5

Exemple 18 : transfert d'un gène codant pour la phosphatase alcaline sécrétée (SeAP) et cinétique d'expression de la SeAP.

10 Cet exemple illustre la capacité du procédé selon l'invention de transformer le muscle en un organe sécréteur d'un polypeptide d'intérêt thérapeutique ou vaccinal et d'assurer la présence dans la circulation sanguine d'une concentration élevée et stable du polypeptide d'intérêt.

15 Dans cet exemple le procédé d'électrotransfert à été testé sur la souris adulte avec un plasmide comprenant le gène codant pour la phosphatase alcaline sécrétée placentaire humaine. Des souris C57BL6 adultes ont reçu, dans le muscle tibial cranial et de manière unilatérale, une injection de plasmide pXL3010.

20 Le plasmide pXL3010 (Figure 13) est un vecteur dérivé de ColE1 dans lequel le gène codant pour la phosphatase alcaline sécrétée provenant de pSEAP-basic (Clontech, Genbank: CVU09660) a été introduit sous contrôle du promoteur CMV provenant du plasmide pCDNA3 (Invitrogen, Pays-Bas) et du signal de poly-25 adénylation de la région tardive du virus SV40 (Genbank SV4CG).

Les conditions d'électrotransfert sont les suivantes : champ électrique 200 V/cm, 8 impulsions de 20 msec, fréquence 1 Hz. Le champ électrique est appliqué 20 secondes après injection. Les prélèvement sanguins sont réalisés 7 jours plus tard au niveau du plexus rétroorbitaire. La concentration en phosphatase alcaline dans le sérum est réalisée est mesurée à l'aide d'un test de chemiluminescence (Phospha-light, Tropix, Bedford, MA 01730). L'injection dans le muscle d'un plasmide non codant (pUC19), suivie ou non de l'application d'un champ électrique, permet de vérifier

l'absence de signal correspondant à l'activité phosphatase alcaline endogène. Les résultats sont présentés dans le tableau 12.

Plasmide pXL3010 µg	Plasmide pUC19 µg	Electrotransfert -	Electrotransfert +
0,1	0	0,03 ± 0,01 (n=5)	1,23 ± 0,21 (n=10)
0,3	0	0,05 ± 0,02 (n=5)	1,92 ± 0,33 (n=10)
1	0	0,16 ± 0,04 (n=5)	7,58 ± 1,18 (n=10)
10	0	1,52 ± 0,59 (n=10)	262,87 ± 54,97 (n=10)
400	0	15,64 ± 10,77 (n=5)	2203,11 ± 332,34(n=5)
0,1	9,9	0,088 ± 0,015 (n=5)	21,39 ± 3,54 (n=10)
0,3	9,7	0,90 ± 0,49 (n=5)	95,67 ± 16,15 (n=10)
1	9	0,26 ± 0,09 (n=5)	201,68 ± 32,38 (n=10)
10	0	0,21 ± 0,05 (n=10)	357,84 ± 77,02 (n=10)

5

Tableau 12 : valeurs moyennes ± SEM de la concentration de phosphatase alcaline (SeAP) circulante dans le sang en ng/ml de sérum.

10

Lorsque le plasmide pXL3010 est administré par électrotransfection, on constate une augmentation d'un facteur 140 ou 170 de la concentration de SeAP dans le sang.

L'injection de 400 µg de plasmide (injection de 100 µg d'ADN dans le muscle tibial cranial en bilatéral et en deux fois à 30 minutes d'intervalle avant application du champ électrique) permet d'atteindre avec l'électrotransfert une concentration sérique de 2200 ng/ml en phosphatase alcaline contre 16 ng/ml en l'absence d'électrotransfert.

Il faut noter que l'ajout d'un ADN non codant (pUC19) qui permet de travailler à quantité d'ADN constante (10 µg d'ADN total par souris) permet encore d'améliorer le niveau d'expression de la phosphatase alcaline pour de faibles quantités de plasmide pXL3010 injectées (<1µg).

5 Une cinétique d'expression de la SeAP a été réalisée. La dose de plasmide administrée est de 15 µg par muscle en bilatéral, soit 30 µg par souris. Les résultats sont présentés dans la figure 9. On observe, dès 7 jours après injection, une augmentation importante et durable (au moins pendant 2 mois) de la concentration de SeAP détectée dans le sang lorsque le plasmide pXL3010 est administré par
10 électrotransfert.

L'ensemble de ces résultats confirme que le transfert d'acides nucléiques dans le muscle avec le procédé selon l'invention permet d'obtenir un niveau d'expression élevé et durable, aussi bien pour des protéines localisées dans le muscle que pour des protéines sécrétées et qu'il est ainsi possible de transformer le muscle en un organe
15 secréteur de polypeptide d'intérêt.

Exemple 19 : transfert d'un gène codant pour l'érythropoïétine (EPO)

Des souris C57Bl/6 adultes ont reçu, dans le muscle tibial cranial et de manière unilatérale, une injection de plasmide pXL3348. Le plasmide pXL3348 (Figure 16) est
20 un vecteur dérivé du plasmide pXL2774 dans lequel le gène murin de l'erythropoïétine (NCBI : 193086) a été introduit sous contrôle du promoteur provenant de la région précoce du cytomegalovirus humain (hCMV IE) et du signal de poly-adénylation de la région tardive du virus SV40 (Genbank SV4CG).

Les conditions d'électrotransfert sont les suivantes : intensité champ électrique
25 200 V/cm, 8 impulsions de 20 msec, fréquence 1 Hz. Le champ électrique est appliqué immédiatement après injection de l'ADN plasmidique.

	Erythropoïetine sérique (mIU/ml) à J7		Erythropoïetine sérique (mIU/ml) à J24	
Plasmide	Electrotransfert -	Electrotransfert +	Electrotransfert -	Electrotransfert +
pXL3348 (1 µg)	0	3,0 ± 1,6	0	1,12 ± 0,8
pXL3348 (10 µg)	0,9 ± 0,9	61,8 ± 15,8	0	74,1 ± 28,9
pUC19 (1 µg)		0		0
	Hématocrite % Prélèvement à J7		Hématocrite % Prélèvement à J24	
Plasmide	Electrotransfert -	Electrotransfert +	Electrotransfert -	Electrotransfert +
pXL3348 (1 µg)	38,5 ± 0,5	35,0 ± 3,6	50,8 ± 2,3	81 ± 0,5
pXL3348 (10 µg)	32,0 ± 3,2	26,0 ± 4,1	69,0 ± 5,1	83,0 ± 1,0
pUC19 (1 µg)		30,8 ± 2,3		43,2 ± 0,9

On observe, avec l'électrotransfert, une très nette augmentation de la quantité d'érythropoïétine dans le sang à J7 et J24 pour l'administration de 10 µg de pXL3348. De plus, l'effet physiologique de l'augmentation d'érythropoïétine qui se traduit par une augmentation de l'hématocrite est très important (85 %), dès J7 et ce, même pour une 5 très faible quantité de plasmide (1 µg).

Exemple 20 : transfert d'un gène codant pour le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)

Des souris C57Bl6 ou SCID adultes ont reçu, dans le muscle tibial cranial et de 10 manière bilatérale, une injection de pCOR hVEGF (pXL3212 , 15 µg).

Le plasmide pXL3212 (Figure 11) est un vecteur dérivé du plasmide pXL2774 (WO97/10343) dans lequel l'ADNc codant pour le VEGF165 (Vascular Endothelial Growth Factor, Genbank: HUMEGFAA) a été introduit sous contrôle du promoteur provenant de la région précoce du cytomégalovirus humain (hCMV IE) et du signal de 15 poly-adénylation de la région tardive du virus SV40 (Genbank SV4CG).

Les conditions d'électrotransfert sont les suivantes : intensité champ électrique 250 V/cm, 8 impulsions de 20 msec., fréquence 2 Hz. Les prélèvements sanguins ont été réalisés au niveau du plexus rétroorbitaire. Les prélèvements ont été effectués un jour avant, et sept jours après, l'injection du plasmide. Le dosage immuno-enzymatique 20 du VEGF humain a été réalisé à l'aide du kit Quantikine (R&D System). Le test a été étalonné avec du VEGF humain dans du sérum de souris. Les résultats sont présentés dans le tableau 14

Lignée de souris	Jour du dosage	Electrotransfert	VEGF humain (ng/litre)
C57BL6	J -1	-	non détectable
C57BL6	J +7	+	393 + 110
SCID	J -1	-	non détectable
SCID	J +7	+	99 + 26

Tableau 14 : concentration sérique (ng/litre) en VEGF chez des souris C57Bl6 et SCID.

Exemple 21 : transfert d'un gène codant pour le facteur IX.

Des souris C57Bl6 ou SCID adultes ont reçu, dans le muscle tibial cranial et de manière bilatérale, une injection de pXL3388 (15 µg).

Le plasmide pXL3388 (Figure 12) est un vecteur dérivé du plasmide pXL2774 5 (WO97/10343) dans lequel l'ADNc codant pour le facteur IX humain (facteur Christmas), Genbank: HUMFIXA) a été introduit sous contrôle du promoteur provenant de la région précoce du cytomegalovirus humain (hCMV IE, Genbank HS5IEE) et du signal de poly-adénylation de la région tardive du virus SV40 (Genbank SV4CG).

10 Les conditions d'électrotransfert sont les suivantes : intensité champ électrique 200 V/cm, 8 impulsions de 20 msec., fréquence 2 Hz. Les prélèvements sanguins ont été réalisés au niveau du plexus rétroorbitaire. Les prélèvements ont été effectués sept jours après injection du plasmide. Les résultats sont présentés dans le tableau 15.

Lignée de souris	injection	Electrotransfert	Facteur IX humain (µg/L)
C57BL/6	pXL3388	+	69 ± 12
C57BL/6	pXL3388	-	non détectable
C57BL/6	NaCl 0,9 %	+	non détectable
SCID	pXL3388	+	66 ± 5
SCID	pXL3388	-	non détectable

15

Tableau 15 : concentration plasmatique en facteur IX chez des souris C57Bl6 et SCID.

Le facteur IX humain n'est détectable dans le sang que lorsque le plasmide a été administré dans les conditions du procédé selon l'invention.

5 **Exemple 22 : transfert d'un gène codant pour le facteur de croissance des fibroblastes 1 (FGF1).**

Des souris C57BL6 ou SCID adultes ont reçu, dans le muscle tibial cranial et de manière bilatérale, une injection de pCOR FGF1 (pXL3096, 15 µg).

Le plasmide pXL3096 (Figure 14) est un vecteur dérivé du plasmide pXL2774 (WO97/10343) additionné d'une séquence capable de former une triple hélice (TH, Wils et al., 1997. Gene Ther 4:323-330) dans lequel le gène codant pour une fusion entre le peptide signal de l'interféron de fibroblastes humain et l'ADNc du FGF1 (Fibroblast Growth Factor1) (sp-FGF1, Jouanneau et al., 1991 PNAS 88:2893-2897) a été introduit sous contrôle du promoteur provenant de la région précoce du cytomegalovirus humain (hCMV IE) suivi de la séquence leader (transcrite, non traduite) du gène TK de HSV1 et du signal de poly-adénylation de la région tardive du virus SV40 (Genbank SV4CG).

Les conditions d'électrotransfert sont les suivantes : intensité champ électrique 200 V/cm, 8 impulsions de 20 msec., fréquence 2 Hz. La présence de FGF1 est ensuite 20 révélée par immuno-histochimie.

Les résultats pour les souris C57BL6 sont présentés sur la figure 10. On constate que le nombre de fibres positives est très largement supérieur pour le groupe soumis au champ électrique par rapport au groupe contrôle (ayant reçu une injection de pXL3096 mais non soumis au champ électrique). La présence de FGF1 pour le 25 groupe contrôle est quasiment indétectable à J21 et J35 alors qu'un nombre important de fibres positives reste observable pour les groupes traités par électrotransfert.

Les résultats pour les souris SCID sont présentés dans le tableau 16.

	Electrotransfert	Tibial cranial gauche	Tibial cranial droit
pXL 3096 (15µg)	+	600 700	450 300
pXL 3096 (15µg)	-	3 3 0	0 0 0
pXL 3096 (1,5µg)	+	80 20 110	70 35 100
pXL 3096 (1,5µg)	-	0 0	0 1

Tableau 16 : expression de FGF, étude immunohistochimique et nombre de fibres positives sur une section musculaire prise dans la partie médiane du muscle

L'expression de FGF1, telle que déterminée par le nombre de fibres positives révélées par immuno-histochimie, est détectée uniquement dans les muscles soumis au champ électrique. Il est à noter que l'expression de FGF1 est détectée même pour une faible dose de plasmide administré (1,5 µg).

Exemple 23 : transfert d'un gène codant pour le facteur neurotrophique NT3

Le procédé selon l'invention a été appliqué sur la souris adulte (C57B16) et le sourceau *Xt/pmn* pour le transfert du gène codant pour la neurotrophine 3 (NT3). Les souris *pmn* constituent un modèle murin de la sclérose amyotrophique latérale (SLA) caractérisé par une dégénérescence précoce et rapide des motoneurones et par une durée de vie moyenne de 40 jours environ.

23. 1- transfert du gène codant pour NT3 dans des souris adulte

Des souris C57Bl/6 âgées de 5 semaines ont reçu, dans le muscle tibial cranial et de manière unilatérale, une injection de plasmide pXL3149 (12,5 µg) comprenant le 5 gène codant pour la neurotrophine 3 (NT-3) murine.

Le plasmide pXL3149 (Figure 14) est un vecteur dérivé du plasmide pXL2774 (WO97/10343) dans lequel le gène codant pour la neurotrophine 3 (NT-3) murine (Genbank MMNT3) a été introduit sous contrôle du promoteur provenant de la région précoce du cytomégalovirus humain (hCMV IE) et du signal de poly-adénylation de la 10 région tardive du virus SV40 (Genbank SV4CG).

Les conditions d'électrotransfert sont les suivantes : intensité champ électrique 250 V/cm, 4 impulsions de 20 msec., fréquence 1 Hz. Le champ électrique est appliqué immédiatement après injection de l'ADN plasmidique. La présence de NT3 est recherchée dans le surnageant 12000 g des broyats musculaires en tampon PBS, 7 15 jours après le traitement des souris. La quantité de NT3 est mesurée par un dosage ELISA [Kit Promega].

Les valeurs moyennes (\pm intervalle de confiance 95 %) sur 20 muscles sont de 77 \pm 11 pg/muscle (ADN plasmidique administré sans électrotransfert) et de 2700 \pm 900 pg/muscle (ADN plasmidique administré avec électrotransfert).

20 On observe ainsi une augmentation d'un facteur 55 de la quantité de NT3 produite dans le muscle lorsque le plasmide pXL3149 est transféré dans les conditions du procédé selon l'invention.

23. 2- transfert du gène codant pour NT3 dans des souriceaux

25 Une expérience comparable a été réalisée sur des souris Xt pmn hétérozygotes agées de 4 à 5 jours avec le plasmide pXL3149. Les doses injectées sont 130 µg par animal et les injections sont réalisées en multisite dans différents muscles de l'animal (gastrocnémien 25 µg, tibial cranial 12,5 µg).

Les conditions d'électrotransfert sont les suivantes : intensité champ électrique 500 V/cm, 4 impulsions de 20 msec., fréquence 1 Hz.

La présence de NT3 est recherchée 7 jours après administration du plasmide dans le plasma et dans le muscle (gastrocnémien ou tibial cranial). Un témoin du niveau basal de NT3 est réalisé par administration d'une solution de NaCl 0,9 %. La quantité de NT3 est déterminée par un dosage ELISA [Kit Promega]. Les résultats sont présentés dans le tableau 17.

	NaCl 0,9 %		pXL3149	
Electrotransfert	-	+	-	+
Plasma	0 (n=2)	0 (n=2)	46 ± 10 (n=4)	1599 ± 639 (n=4)
Muscle gastrocnémien	3619 ± 102 (n=4)	1619 ± 150 (n=2)	3647 ± 1078 (n=8)	19'754 ± 3818 (n=8)
Muscle tibial cranial	1415 ± 363 (n=4)	1453 ± 375 (n=2)	1400 ± 155 (n=8)	16 826 ± 3135 (n=8)

Tableau 17 : valeurs moyennes ± SEM de la quantité de NT3 (pg par muscle et 10 pg par ml de plasma).

Dans les conditions de l'expérience, on observe un niveau basal du signal de détection de NT3 dans le muscle gastrocnémien et dans le muscle tibial cranial. En l'absence d'électrotransfert, le niveau d'expression du gène NT3 obtenu pour 15 l'injection du plasmide pXL3149 n'est pas supérieur au niveau basal de détection de NT3 dans le muscle. Lorsque le plasmide est administré avec le procédé selon l'invention, on constate que la quantité de NT3 détectée dans le muscle est très significativement augmentée. On observe également que la quantité de NT3 sécrétée

par le muscle et détectée dans le plasma est très nettement augmentée dans ces conditions (facteur augmentation ~ x 35) .

Ces résultats démontrent, que pour une quantité d'ADN donnée, le procédé selon l'invention permet d'augmenter le façon très significative l'efficacité du transfert 5 d'ADN et d'obtenir, non seulement dans le muscle mais également dans le plasma, une augmentation importante la quantité d'une neurotrophine telle que NT3.

Exemple 24 : transfert du gène codant pour l'hormone de croissance humaine.

10 Des souris C57Bl/6 ont reçu, dans le muscle tibial cranial et de manière unilatérale, une injection de plasmide pXL3353 (10 µg) ou de plasmide pXL3354 (10 µg). Le plasmide pXL3353 (figure 15) est un vecteur dérivé du plasmide pXL2774 dans lequel le gène entier de l'hormone de croissance humaine (fragment XbaI/SphI hGH qui s'étend du signal de début de transcription, site BamH1 , jusqu'à 224 bp 15 après le site poly A) a été introduit sous contrôle du promoteur provenant de la région précoce du cytomégalovirus humain (hCMV IE) et du signal de poly-adénylation de la région tardive du virus SV40.

Le cDNA du gène de l'hormone de croissance humaine a été obtenu par transcription réverse d'une banque de mRNA poly(A+) de la glande pituitaire humaine 20 suivie de 30 cycles d'amplification PCR avec les oligonucléotides suivants :

Oligonucléotide complémentaire de la région 5':

5'- GGGTCTAGAGCCACCATGGCTACAGGGCTCCGGAC -3'

Cet oligonucléotide contient un site XbaI et la séquence kozak.

Oligonucléotide complémentaire de la région 3':

25 5'- GGGATGCATTTACTAGAAGCCACAGCTGCCTC-3'

Cet oligonucléotide contient un site NsiI et le codon stop.

Le fragment amplifié a été introduit dans le plasmide pCR2.1 (TA Cloning kit, Invitrogen) et séquencé. Un fragment XbaI/NsiI de 681 bp contenant le cDNA de hGH a été ligaturé avec le fragment XbaI/NsiI de pXL3353 pour générer le plasmide pXL3354 (figure 15).

5 Les conditions d'électrotransfert sont les suivantes : intensité champ électrique 200 V/cm, 8 impulsions de 20 msec., fréquence 1 Hz. Le champ électrique est appliqué immédiatement après injection de l'ADN plasmidique. La présence de hGH est recherchée, 7 jours après le traitement des souris, dans le surnageant des broyats musculaires en tampon PBS centrifugés à 12 000 g. La quantité de hGH est mesurée
10 par un dosage ELISA (Boehringer Manheim).

	Injection hGH génomique (pXL3353)		Injection hGH cDNA (pXL3354)	
Electrotransfert	-	+	-	+
Muscle Tibial Cranial	87,1 ± 9,3 (n=10)	1477,6 ± 67,6 (n=10)	2820,0 ± 487,5 (n=10)	15739,1 ± 915,5 (n=10)

Tableau18 : valeurs moyennes ± SEM de la protéine hGH (picogrammes)/muscle

15 Ces résultats montrent que l'électrotransfert permet d'obtenir une augmentation très importante l'hormone de croissance humaine. Il est à noter que cette amplification est également observée avec le plasmide contenant le gène entier avec toutes ses séquences de régulation.

20 **Exemple 25 : Effet de l'électrotransfert sur l'expression de transgènes vaccinaux**

Cet exemple met en évidence que le procédé selon l'invention est également applicable au transfert de gènes codant pour des polypeptides d'intérêt vaccinal.

25 L'expérience est réalisée chez des souris Balb/c femelles âgées de 9 semaines.
Les électrodes utilisées sont des électrodes plates en acier inoxydable distantes de 5

mm. Le VR-HA est un ADN plasmidique comportant le gène de l'hémagglutinine du virus de la grippe (souche A/PR/8/34). Le VR-gB est un ADN plasmidique comportant le gène de la glycoprotéine B (gB) du cytomégalovirus humain (souche Towne).

5 La solution de plasmide (50 µl d'une solution à 20 µg /ml ou 200 µg /ml dans NaCl 0,9 %) est injectée longitudinalement à travers la peau dans le muscle tibial cranial de manière unilatérale. Les impulsions électriques sont appliquées 20 sec après l'administration du plasmide, perpendiculairement à l'axe du muscle à l'aide d'un générateur d'impulsions carrées (intensité champ électrique 200 V/cm, 8 impulsions
10 consécutives d'une durée de 20 msec, fréquence 1 Hz).

Pour l'évaluation de la stimulation de la réponse immunitaire, le protocole d'immunisation suivant a été suivi :

J 0 prélèvement du sérum préimmun

J 1 primo-injection, plus ou moins électrotransfert

15 J 2 prélèvement du sérum immun

J 2 injection de rappel, plus ou moins électrotransfert

J 42 prélèvement de sérum immun

J 63 prélèvement de sérum immun

Les prélèvements sanguins sont effectués au niveau du sinus rétro-orbital. Les
20 dosages des anticorps spécifiques sont réalisés par ELISA. Chaque condition expérimentale est testée sur 10 animaux injectés en unilatéral.

Les résultats concernant les titres en anticorps dirigés contre l'hémagglutinine du virus de la grippe sont présentés dans le tableau 19A.

	Electrotransfert	J0	J21	J42	J63
VR-HA (1 µg)	-	< 50	132 ± 739	1201 ± 4380	1314 ± 2481
VR-HA (1 µg) (p)	+	< 50	1121 ± 1237 (0.0135)	10441 ± 7819 (0.0022)	8121 ± 5619 (0.0033)
VR-HA (10 µg)	-	< 50	781 ± 666	5113 ± 16015	4673 ± 8238
VR-HA (10 µg) (p)	+	< 50	4153 ± 2344 (0.0002)	74761 ± 89228 (0.0005)	41765 ± 52361 (0.0007)

5 Tableau 19-a : titres en anticorps dirigés contre l'hémagglutinine du virus de la grippe, obtenus après injection de 1 ou 10 µg d'ADN (VR-HA) en absence ou en présence d'impulsions électriques. Les résultats sont les moyennes géométriques de 10 animaux (8 animaux pour le groupe injecté avec 1 µg d'ADN en présence d'impulsions électriques et prélevés à J63) ± écart-type. La valeur de p a été obtenue par comparaison deux à deux des groupes injectés en présence et en absence d'impulsions électriques en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney.

10

15 Ces résultats montrent que les titres en anticorps dirigés contre l'hémagglutinine du virus de la grippe sont augmentés d'un facteur 10 environ dans les groupes soumis aux impulsions électriques. Ainsi les souris ayant reçu 1 µg d'ADN en présence d'impulsions électriques présentent un titre moyen en anticorps légèrement supérieur à celui des souris ayant reçu 10 µg d'ADN en absence d'impulsion électrique.

Les résultats concernant les titres en anticorps dirigés contre la glycoprotéine B du cytomégavirus humain sont présentés dans le tableau 19B.

	Electrotransfert	J 0	J 21	J 42	J 63
VR-gB (10 µg)	-	< 50	73 ± 138	755 ± 1766	809 ± 1363
VR-gB (10 µg) (p)	+	< 50	200 ± 119 (0,0558)	3057 ± 1747 (0,0108)	2112 ± 1330 (0,0479)

Tableau 19 B : titres en anticorps dirigés contre la glycoprotéine B (gB) du cytomagalovirus humain obtenus après injection de 10 µg d'ADN (VR-gB) en absence ou en présence d'impulsions électriques. Les résultats sont les moyennes géométriques de 10 animaux (9 animaux pour le groupe injecté en présence d'impulsions électriques) ± écart-type. La valeur de p a été obtenue par comparaison deux à deux des groupes injectés en présence et en absence d'impulsions électriques en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney.

Ces résultats montrent que les titres en anticorps dirigés contre la glycoprotéine B du cytomégalovirus humain sont augmentés d'un facteur 4 à J42, dans le groupe soumis aux impulsions électriques. On note également que le coefficient de variation est en moyenne trois fois plus faible dans les groupes d'animaux soumis aux impulsions électriques.

Revendications

- 1) Procédé de transfert d'acide nucléique dans un ou plusieurs muscles striés *in vivo* dans lequel les cellules du muscle sont mises en contact avec l'acide nucléique à transferer par administration directe dans le tissu ou par administration topique ou systémique et dans lequel le transfert est assuré par application au dit muscle d'une ou plusieurs impulsions électriques d'une intensité comprise entre 1 et 800 volts/cm.
5
- 2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'intensité du champ est comprise entre 4 et 400 volts/cm.
10
- 3) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'intensité du champ est comprise entre 30 et 300 volts/cm.
15
- 4) Procédé selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que la durée totale d'application du champ électrique est supérieure à 10 millisecondes.
- 5) Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'application au muscle du champ électrique comprend une ou plusieurs impulsions de fréquence régulière.
20
- 6) Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'application au muscle du champ électrique comprend entre 1 et 100 000 impulsions de fréquence comprise entre 0,1 et 1000 hertz.
25
- 7) Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les impulsions électriques sont délivrées de façon irrégulière les unes par rapport aux autres et en ce que la fonction décrivant l'intensité du champ électrique en fonction du temps d'une impulsion est variable.
30

8) Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l'intégrale de la fonction décrivant la variation du champ électrique avec le temps est supérieure à $1 \text{ kV} \cdot \text{msec}/\text{cm}$.

5 9) Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que cette intégrale est supérieure ou égale à $5 \text{ kV} \cdot \text{msec}/\text{cm}$.

10 10) Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que les impulsions électriques sont choisies parmi les impulsions à ondes carrées, les champs électriques générant des ondes à décroissance exponentielle, des ondes unipolaires oscillantes de durée limitée, des ondes bipolaires oscillantes de durée limitée, ou d'autres formes d'ondes.

15 11) Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que les impulsions électriques comprennent des impulsions à ondes carrées.

20 12) Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que les impulsions électriques sont appliquées avec des électrodes placées de part et d'autre du muscle ou placées au contact de la peau.

25 13) Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que les impulsions électriques sont appliquées avec des électrodes introduites à l'intérieur du muscle.

30 14) Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que l'acide nucléique est injecté dans le muscle.

 15) Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que l'acide nucléique est injecté par voie systémique.

 16) Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que l'acide nucléique est injecté par voie intra-artérielle ou intra-veineuse.

17) Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que l'acide nucléique est administré par voie topique, cutanée, orale, vaginale, intranasale, sous cutanée ou intra-oculaire.

5 18) Procédé selon l'une des revendications 1 à 17, caractérisé en ce que l'acide nucléique est présent dans une composition contenant, en outre, des excipients pharmaceutiquement acceptables pour les différents modes d'administration.

10 19) Composition selon la revendication 18, adapté à l'administration parentérale.

20 20) Procédé selon l'une des revendications 1 à 19, caractérisé en ce que l'acide nucléique est un acide désoxyribonucléique.

15 21) Procédé selon l'une des revendications 1 à 19, caractérisé en ce que l'acide nucléique est un acide ribonucléique.

20 22) Procédé selon l'une des revendications 1 à 21, caractérisé en ce que l'acide nucléique est d'origine synthétique ou biosynthétique, ou extrait d'un virus ou d'un organisme procaryote ou eucaryote unicellulaire ou pluricellulaire.

25 23) Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que l'acide nucléique administré est associé à tout ou partie des composants de l'organisme d'origine et/ou du système de synthèse.

24) Procédé selon l'une des revendications 1 à 23, caractérisé en ce que l'acide nucléique code pour un ARN ou une protéine d'intérêt.

30 25) Procédé selon la revendication 24, caractérisé en ce que l'ARN est un ARN catalytique ou antisens.

26) Procédé selon la revendication 24, caractérisé en ce que l'acide nucléique code pour une protéine choisie parmi les enzymes, les dérivés sanguins, les

hormones, les lymphokines, les facteurs de croissance, les facteurs trophiques, les facteurs angiogéniques, les facteurs neurotrophiques, les facteurs de croissance osseuse, les facteurs hématopoïétiques, les facteurs de coagulation, les antigènes et les protéines impliquées dans le métabolisme des acides aminés, des lipides et des autres 5 constituants essentiels de la cellule.

27) Procédé selon la revendication 26, caractérisé en ce que l'acide nucléique code pour les facteurs angiogéniques VEGF et FGF, les facteurs neurotrophiques BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, FGF1, NT3, NT5, la protéine Gax, 10 l'insuline pour le traitement du diabète, l'hormone de croissance, une cytokine, l' α -1-antitrypsine, la calcitonine, la leptine et les apolipoprotéines, les enzymes de biosynthèse des vitamines, des hormones et des neuromédiateurs.

28) Procédé selon la revendication 24, caractérisé en ce que l'acide nucléique code pour un anticorps, un fragment variable d'anticorps simple chaîne (ScFv) ou tout autre fragment d'anticorps possédant des capacités de reconnaissance dans un but d'immunothérapie, ou code pour un récepteur soluble, pour un peptide agoniste ou antagoniste d'un récepteur ou d'une protéine d'adhésion, pour une protéine artificielle, chimérique ou tronquée. 15
20

29) Procédé selon la revendication 28, caractérisé en ce que l'acide nucléique code pour un anticorps antiidiotype, un fragment soluble du récepteur CD4 ou du récepteur du TNF α ou du récepteur de l'acétylcholine.

30) Procédé selon l'une des revendications 26 à 29, caractérisé en ce que l'acide nucléique code pour un précurseur d'une protéine thérapeutique.

31) Procédé selon l'une des revendications 1 à 30, caractérisé en ce que l'acide nucléique est sous forme d'un plasmide.

30
32) Procédé selon l'une des revendications 1 à 30, caractérisé en ce que l'acide nucléique contient un gène de grande taille et/ou des introns et/ou des éléments régulateurs de petite ou de grande taille.

33) Procédé selon l'une des revendications 1 à 30, caractérisé en ce que l'acide nucléique est un ADN épisomal ou un chromosome artificiel de levure ou un minichromosome.

5

34) Procédé selon l'une des revendications 1 à 33, caractérisé en ce que l'acide nucléique contient des séquences permettant et/ou favorisant l'expression du transgène dans le muscle.

10

35) Procédé selon l'une des revendications 1 à 34, caractérisé en ce que l'acide est associé à tout type de vecteurs ou à toute combinaison de vecteurs permettant d'améliorer le transfert d'acide nucléique tels que des virus, des agents synthétiques ou biosynthétiques, ou encore des billes propulsées ou non.

15

36) Procédé selon l'une des revendications 1 à 35, caractérisé en ce que le muscle est soumis à un traitement visant à améliorer le transfert de gène, un traitement de nature pharmacologique en application locale ou systémique, ou un traitement enzymatique, perméabilisant, chirurgical, mécanique, thermique ou physique.

20

37) Procédé selon l'une des revendications 1 à 36, caractérisé en ce qu'il permet de faire produire par le muscle un agent à des doses physiologiques et/ou thérapeutiques, soit dans les cellules musculaires, soit secrété.

25

38) Procédé selon l'une des revendications 1 à 37, caractérisé en ce qu'il permet de moduler la quantité de transgène exprimé en modulant le volume de tissu musculaire transfecté.

30

39) Procédé selon la revendication 38, caractérisé en ce qu'il permet de moduler le volume de tissu musculaire transfecté par l'utilisation de sites multiples d'administration.

40) Procédé selon l'une des revendications 1 à 39, caractérisé en ce qu'il permet de moduler la quantité de transgène exprimé en modulant le nombre, la forme,

la surface et la disposition des électrodes, et en variant l'intensité, le nombre, la durée, la fréquence et la forme des impulsions, ainsi que la quantité et le volume d'administration de l'acide nucléique.

5 41) Procédé selon l'une des revendications 1 à 40, caractérisé en ce qu'il permet de contrôler la localisation des tissus transfectés par le volume de tissu soumis aux impulsions électriques locales.

10 42) Procédé selon l'une des revendications 1 à 41, caractérisé en ce qu'il permet un retour à la situation initiale par l'ablation de la zone de tissu transfectée.

15 43) Acide nucléique et champ électrique d'une intensité comprise entre 1 et 800 Volts/cm, comme produit de combinaison pour leur administration simultanée, séparée ou étalée dans le temps *in vivo* au muscle strié et, pour la thérapie génique reposant sur l'électrotransfection *in vivo* dans le muscle strié.

20 44) Produit de combinaison selon la revendication 43, caractérisé en ce que l'intensité du champ est comprise entre 4 et 400 volts/cm.

25 45) Produit de combinaison selon la revendication 43, caractérisé en ce que l'intensité du champ est comprise entre 30 et 300 volts/cm.

20 46) Produit de combinaison selon l'une des revendications 43 à 45, caractérisé en ce que la durée totale d'application du champ électrique est supérieure à 10 millisecondes.

25 47) Produit de combinaison selon l'une des revendications 43 à 46, caractérisé en ce que l'application au muscle du champ électrique comprend une ou plusieurs impulsions de fréquence régulière.

30 48) Produit de combinaison selon la revendication 47, caractérisé en ce que l'application au muscle du champ électrique comprend entre 1 et 100 000 impulsions de fréquence comprise entre 0,1 et 1000 hertz.

49) Produit de combinaison selon l'une des revendications 43 à 46, caractérisé en ce que les impulsions électriques sont délivrées de façon irrégulière les unes par rapport aux autres et en ce que la fonction décrivant l'intensité du champ électrique en fonction du temps d'une impulsion est variable.

50) Produit de combinaison selon l'une des revendications 43 à 49, caractérisé en ce que l'intégrale de la fonction décrivant la variation du champ électrique avec le temps est supérieure à $1 \text{ kV} \cdot \text{msec/cm}$.

10 51) Produit de combinaison selon la revendication 50, caractérisé en ce que cette intégrale est supérieure ou égale à $5 \text{ kV} \cdot \text{msec/cm}$.

15 52) Produit de combinaison selon l'une des revendications 43 à 51, caractérisé en ce que les impulsions électriques sont choisies parmi les impulsions à ondes carrées, les champs électriques générant des ondes à décroissance exponentielle, des ondes unipolaires oscillantes de durée limitée, des ondes bipolaires oscillantes de durée limitée, ou d'autres formes d'ondes.

20 53) Produit de combinaison selon l'une des revendications 43 à 52, caractérisé en ce que les impulsions électriques comprennent des impulsions à ondes carrées.

25 54) Produit de combinaison selon l'une des revendications 43 à 53, caractérisé en ce que les impulsions électriques sont appliquées avec électrodes placées de part et d'autre du muscle ou placées au contact de la peau.

30 55) Produit de combinaison selon l'une des revendications 43 à 53, caractérisé en ce que les impulsions électriques sont appliquées avec des électrodes introduites à l'intérieur du muscle.

56) Produit de combinaison selon l'une des revendications 43 à 55, caractérisé en ce que l'acide nucléique est injecté dans le muscle.

57) Produit de combinaison selon l'une des revendications 43 à 55, 5 caractérisé en ce que l'acide nucléique est injecté par voie systémique.

58) Produit de combinaison selon la revendication 57, caractérisé en ce que l'acide nucléique est injecté par voie intra-artérielle ou intra-veineuse.

10 59) Produit de combinaison selon l'une des revendications 43 à 55, caractérisé en ce que l'acide nucléique est administré par voie topique, cutanée, orale, vaginale, intranasale, sous cutanée ou intra-oculaire.

15 60) Produit de combinaison selon l'une des revendications 43 à 59, caractérisé en ce que l'acide nucléique est présent dans une composition contenant, en outre, des excipients pharmaceutiquement acceptables pour les différents modes d'administration.

20 61) Composition selon la revendication 60, adapté à l'administration parentérale.

62) Produit de combinaison selon l'une des revendications 43 à 61, caractérisé en ce que l'acide nucléique est un acide désoxyribonucléique.

25 63) Produit de combinaison selon l'une des revendications 43 à 61, caractérisé en ce que l'acide nucléique est un acide ribonucléique.

30 64) Produit de combinaison selon l'une des revendications 43 à 63, caractérisé en ce que l'acide nucléique est d'origine synthétique ou biosynthétique, ou extrait d'un virus ou d'un organisme procaryote ou eucaryote unicellulaire ou pluricellulaire.

65) Produit de combinaison selon la revendication 64, caractérisé en ce que l'acide nucléique administré est associé à tout ou partie des composants de l'organisme d'origine et/ou du système de synthèse.

5 66) Produit de combinaison selon l'une des revendications 43 à 65, caractérisé en ce que l'acide nucléique code pour un ARN ou une protéine d'intérêt.

10 67) Produit de combinaison selon la revendication 66, caractérisé en ce que l'ARN est un ARN catalytique ou antisens.

15 68) Produit de combinaison selon la revendication 66, caractérisé en ce que l'acide nucléique code pour une protéine choisie parmi les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines, les cytokines, les facteurs de croissance, les facteurs trophiques, les facteurs angiogéniques, les facteurs neurotrophiques, les facteurs de croissance osseuse, les facteurs hématopoïétiques, les facteurs de coagulation, les antigènes et les protéines impliquées dans le métabolisme des acides aminés, des lipides et des autres constituants essentiels de la cellule.

20 69) Produit de combinaison selon la revendication 68, caractérisé en ce que l'acide nucléique code pour les facteurs angiogéniques VEGF et FGF, les facteurs neurotrophiques BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, FGF1, NT3, NT5, la protéine Gax, l'insuline pour le traitement du diabète, l'hormone de croissance, l' α -1-antitrypsine, la calcitonine, la leptine et les apolipoprotéines, les enzymes de biosynthèse des vitamines, des hormones et des neuromédiateurs.

25 70) Produit de combinaison selon la revendication 66, caractérisé en ce que l'acide nucléique code pour un anticorps, un fragment variable d'anticorps simple chaîne (ScFv) ou tout autre fragment d'anticorps possédant des capacités de reconnaissance dans un but d'immunothérapie, ou code pour un récepteur soluble, 30 pour un peptide agoniste ou antagoniste d'un récepteur ou d'une protéine d'adhésion, pour une protéine artificielle, chimérique ou tronquée.

71) Produit de combinaison selon la revendication 70, caractérisé en ce que l'acide nucléique code pour un anticorps antiidiotype, un fragment soluble du récepteur CD4 ou du récepteur du TNF α ou du récepteur de l'acétylcholine.

5 72) Produit de combinaison selon l'une des revendications 68 à 71, caractérisé en ce que l'acide nucléique code pour un précurseur d'une protéine thérapeutique.

10 73) Produit de combinaison selon l'une des revendications 43 à 72, caractérisé en ce que l'acide nucléique est sous forme d'un plasmide.

15 74) Produit de combinaison selon l'une des revendications 43 à 72, caractérisé en ce que l'acide nucléique contient un gène de grande taille et/ou des introns et/ou des éléments régulateurs de petite ou de grande taille.

20 75) Produit de combinaison selon l'une des revendications 43 à 72, caractérisé en ce que l'acide nucléique est un ADN épisomal ou un chromosome artificiel de levure ou bactérien ou un minichromosome.

25 76) Produit de combinaison selon l'une des revendications 43 à 75, caractérisé en ce que l'acide nucléique contient des séquences permettant et/ou favorisant l'expression du transgène dans le muscle.

30 77) Produit de combinaison selon l'une des revendications 43 à 76, caractérisé en ce que l'acide est associé à tout type de vecteurs ou à toute combinaison de vecteurs permettant d'améliorer le transfert d'acide nucléique tels que des virus, des agents synthétiques ou biosynthétiques, ou encore des billes propulsées ou non.

78) Produit de combinaison selon l'une des revendications 43 à 77, caractérisé en ce que le muscle est soumis à un traitement visant à améliorer le transfert de gène, un traitement de nature pharmacologique en application locale ou

systémique, ou un traitement enzymatique, perméabilisant, chirurgical, mécanique, thermique ou physique.

5 79) Produit de combinaison selon l'une des revendications 43 à 78, caractérisé en ce qu'il permet de faire produire par le muscle un agent à des doses physiologiques et/ou thérapeutiques, soit dans les cellules musculaires, soit secrété.

10 80) Produit de combinaison selon l'une des revendications 43 à 78, caractérisé en ce qu'il permet de moduler la quantité de transgène exprimé en modulant le volume de tissu musculaire transfecté.

15 81) Produit de combinaison selon la revendication 80, caractérisé en ce qu'il permet de moduler le volume de tissu musculaire transfecté par l'utilisation de sites multiples d'administration.

20 82) Produit de combinaison selon l'une des revendications 43 à 81, caractérisé en ce qu'il permet de moduler la quantité de transgène exprimé en modulant le nombre, la forme, la surface et la disposition des électrodes, et en variant l'intensité de champ, le nombre, la durée, la fréquence et la forme des impulsions, ainsi que la quantité et le volume d'administration de l'acide nucléique.

25 83) Produit de combinaison selon l'une des revendications 43 à 82, caractérisé en ce qu'il permet de contrôler la localisation des tissus transfectés par le volume de tissu soumis aux impulsions électriques locales.

30 84) Produit de combinaison selon l'une des revendications 43 à 83, caractérisé en ce qu'il permet un retour à la situation initiale par l'ablation de la zone de tissu transfectée.

Figure 1 : Effets d'impulsions électriques d'intensité de champ élevé sur la transfection d'ADN pxi 2774 dans le muscle tibial cranial chez la souris.

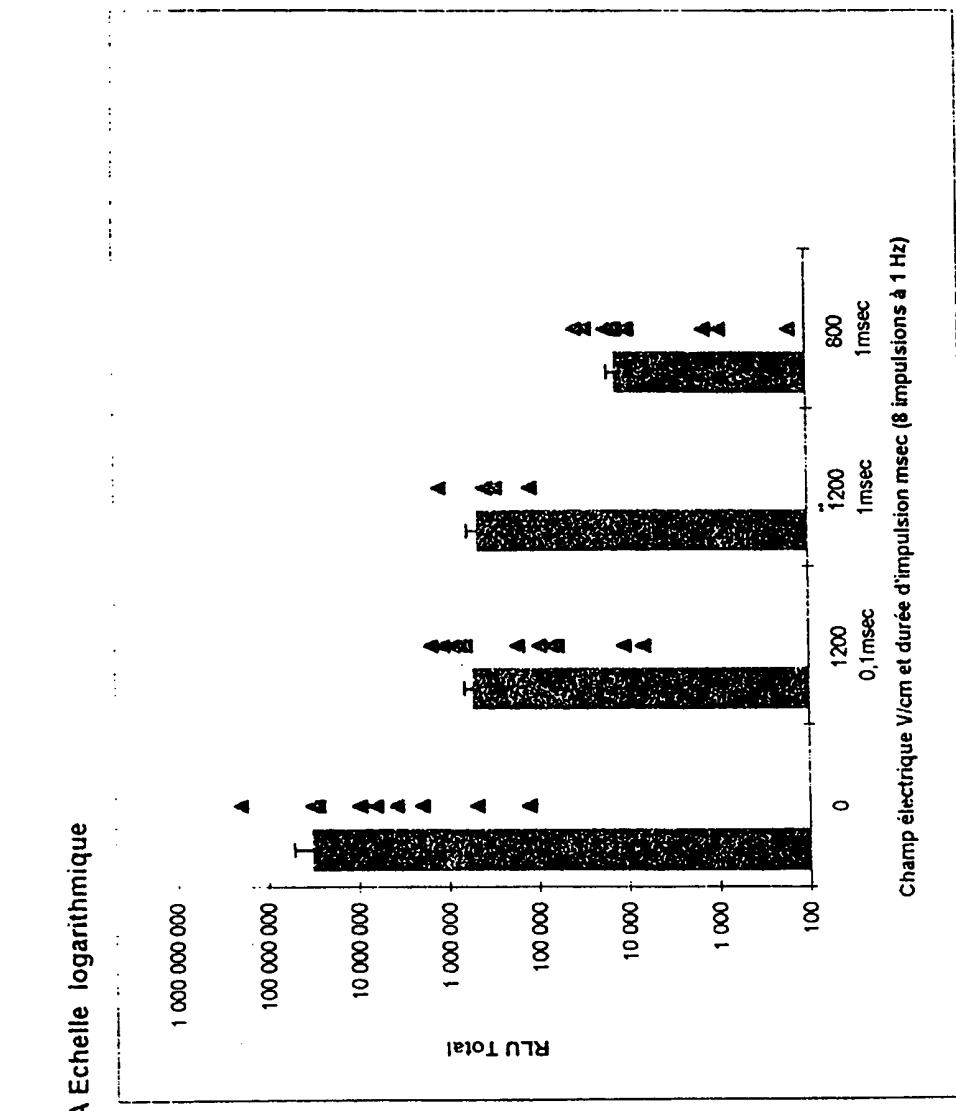


Figure 1a

Figure 1 : Effets d'impulsions électriques d'intensité de champ élevé sur la transfection d'ADN pxi 2774 dans le muscle tibial crânial chez la souris.
Valeurs moyennes + SEM

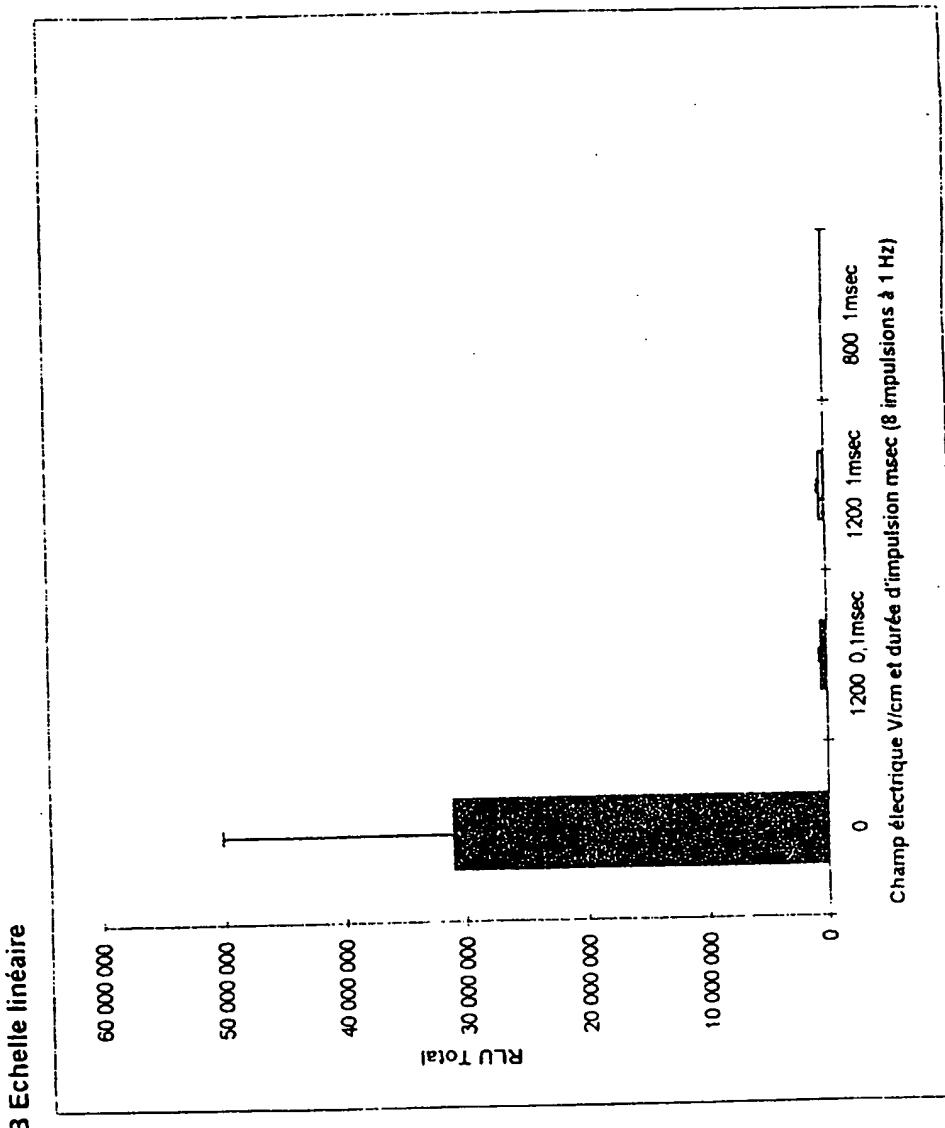


Figure 1 b

Figure 2 : Effets d'impulsions électriques d'intensité de champ intermédiaire sur la transfection d'ADN pxi 2774 dans le muscle tibial cranial chez la souris.
Valeurs moyennes \pm SEM

A Echelle logarithmique

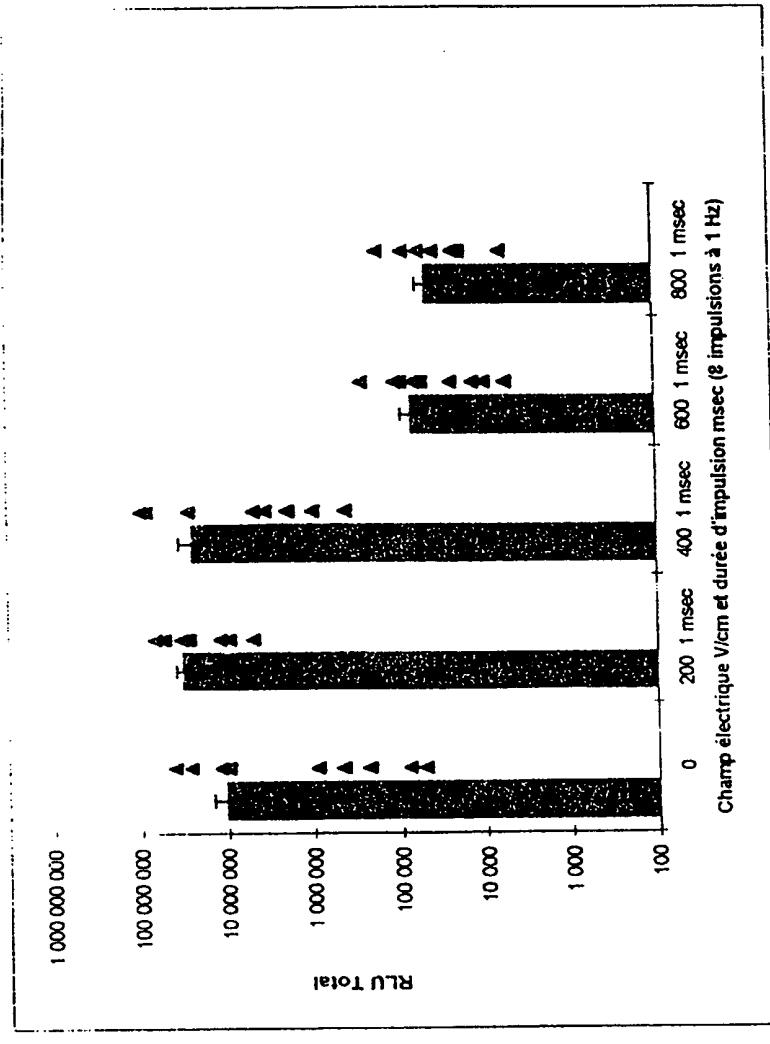


Figure 2a

Figure 2 : Effets d'impulsions électriques d'intensité de champ intermédiaire sur la transfection d'ADN pxi 2774 dans le muscle tibial crânial chez la souris.
Valeurs moyennes \pm SEM

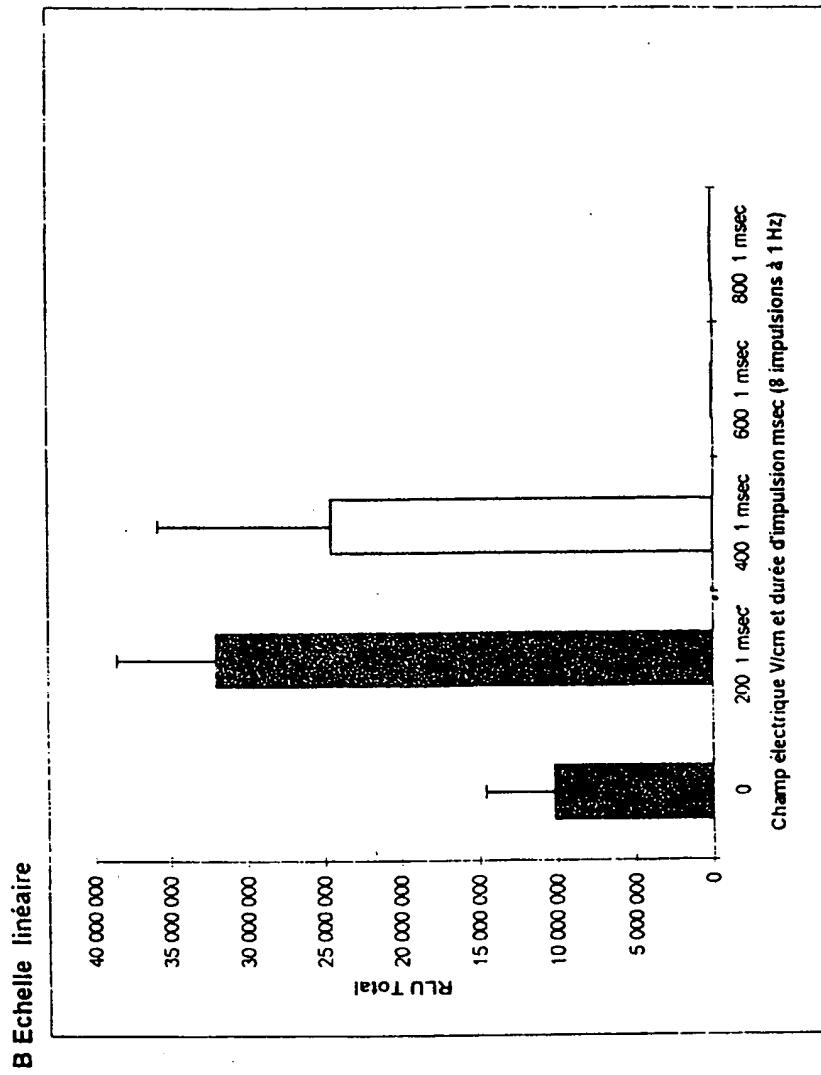


Figure 2b

Figure 3 : Effets d'impulsions électriques d'intensité de champ faible et de différentes durées sur la transfert d'ADN pxi 2774 dans le muscle tibial cranial chez la souris. Valeurs moyennes \pm SEM

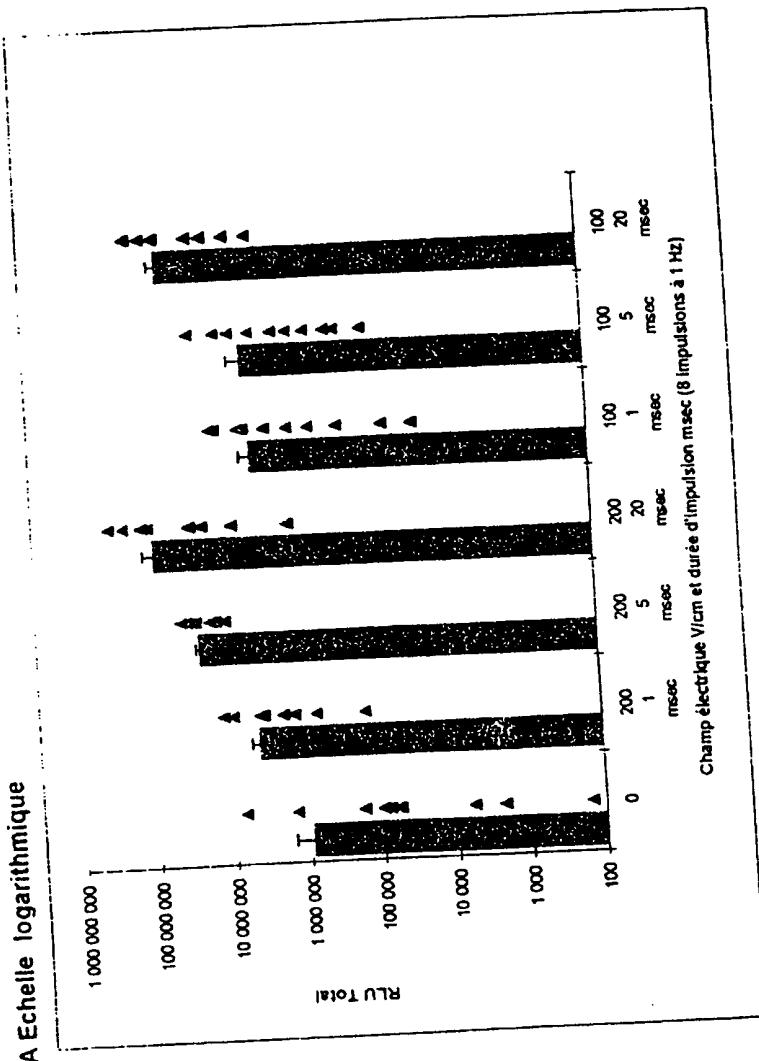


Figure 3a

Figure 3 : Effets d'impulsions électriques d'intensité de champ faible et de différentes durées sur la transfection d'ADN pxi 2774 dans le muscle tibial cranial chez la souris. Valeurs moyennes + SEM

B Echelle linéaire

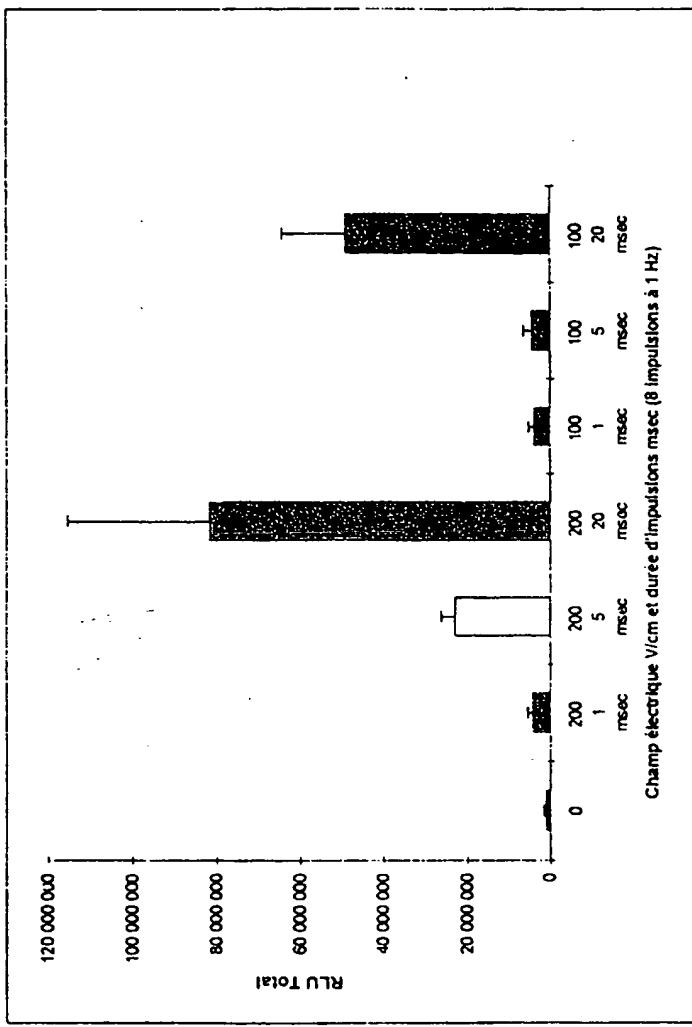


Figure 3b

Figure 4 : Effets d'impulsions électriques d'intensité de champ faible et de différentes durées sur la transfection d'ADN pxi 2774 dans le muscle tibial cranial chez la souris. Valeurs moyennes \pm SEM

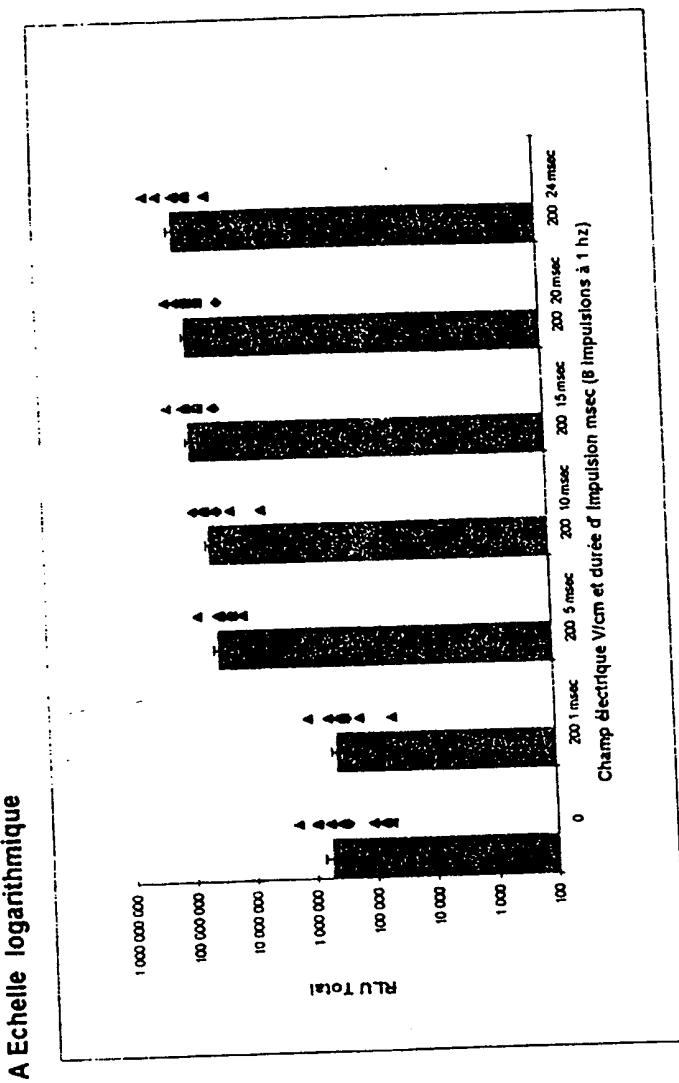


Figure 4a

Figure 4 : Effets d'impulsions électriques d'intensité de champ faible et de différentes durées sur la transfection d'ADN pX1 2774 dans le muscle tibial cranial chez la souris. Valeurs moyennes \pm SEM

B Echelle linéaire

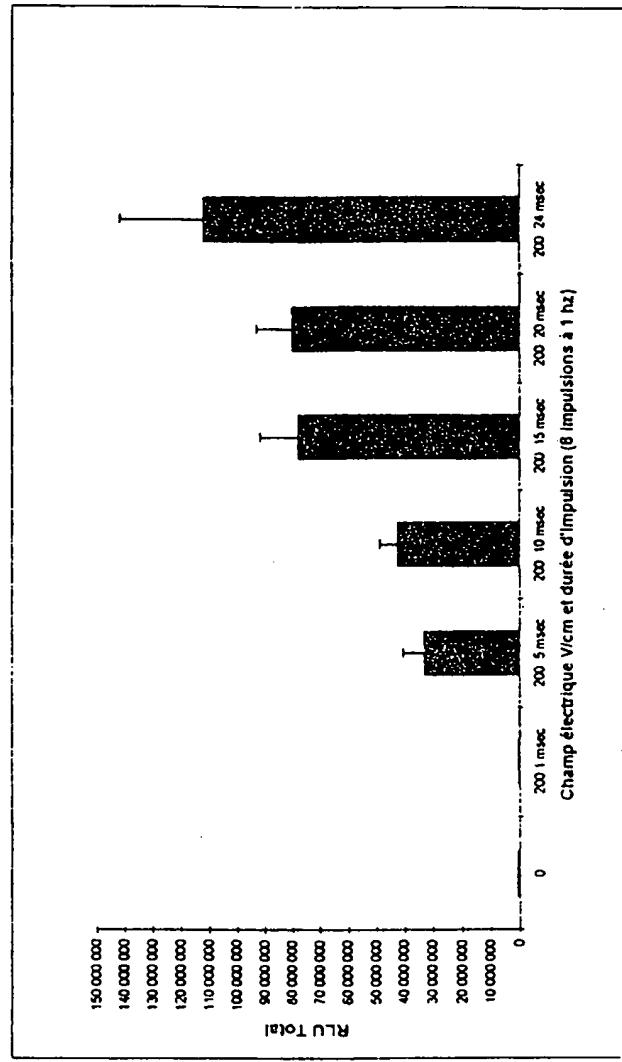


Figure 4 b

Figure 5 : Efficacité de l'électrotransfession de l'ADN pxi 2774 dans le muscle tibial cranial de la souris aux intensités de champs électriques faibles: Valeurs Moyennes \pm SEM

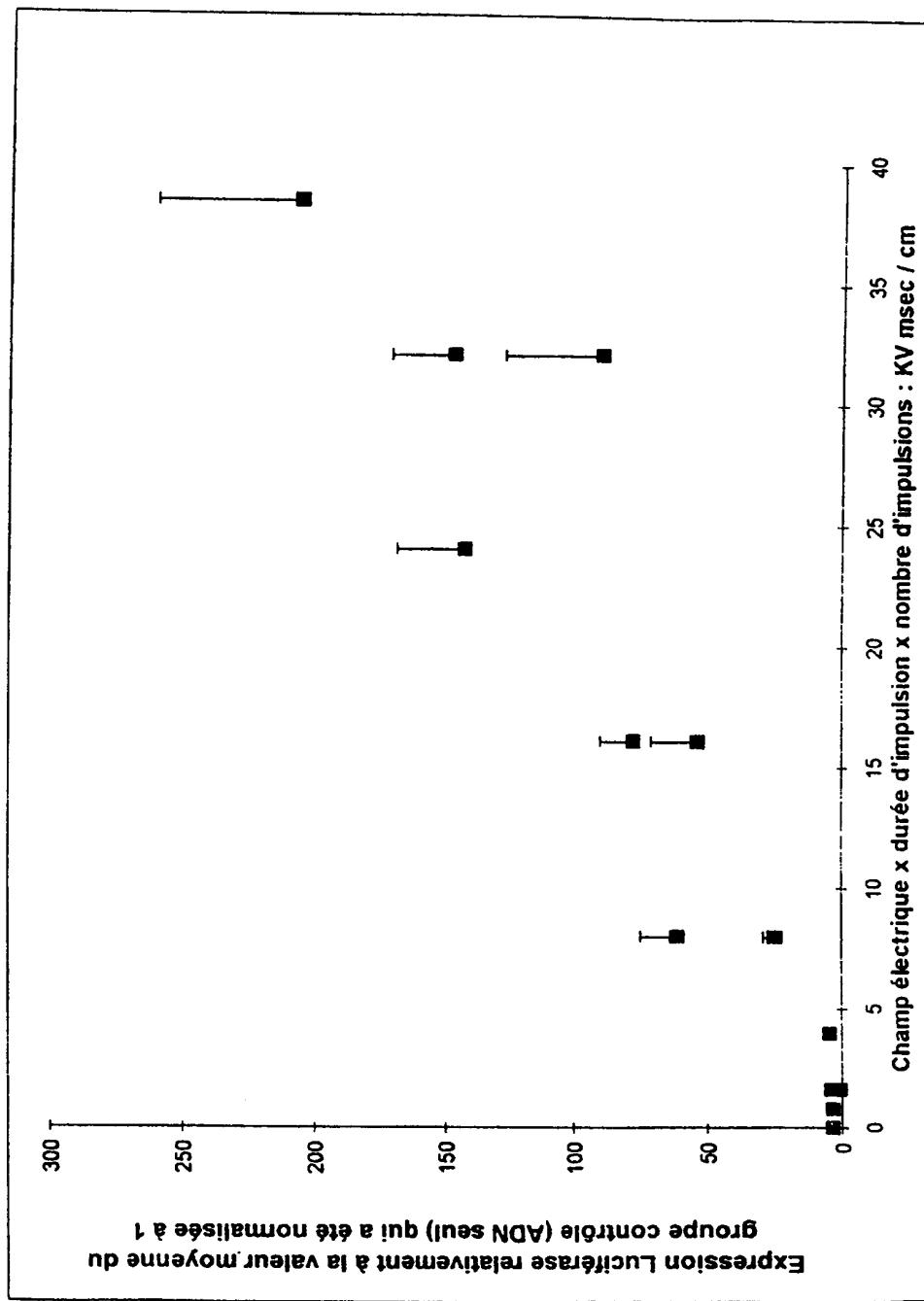


Figure 5

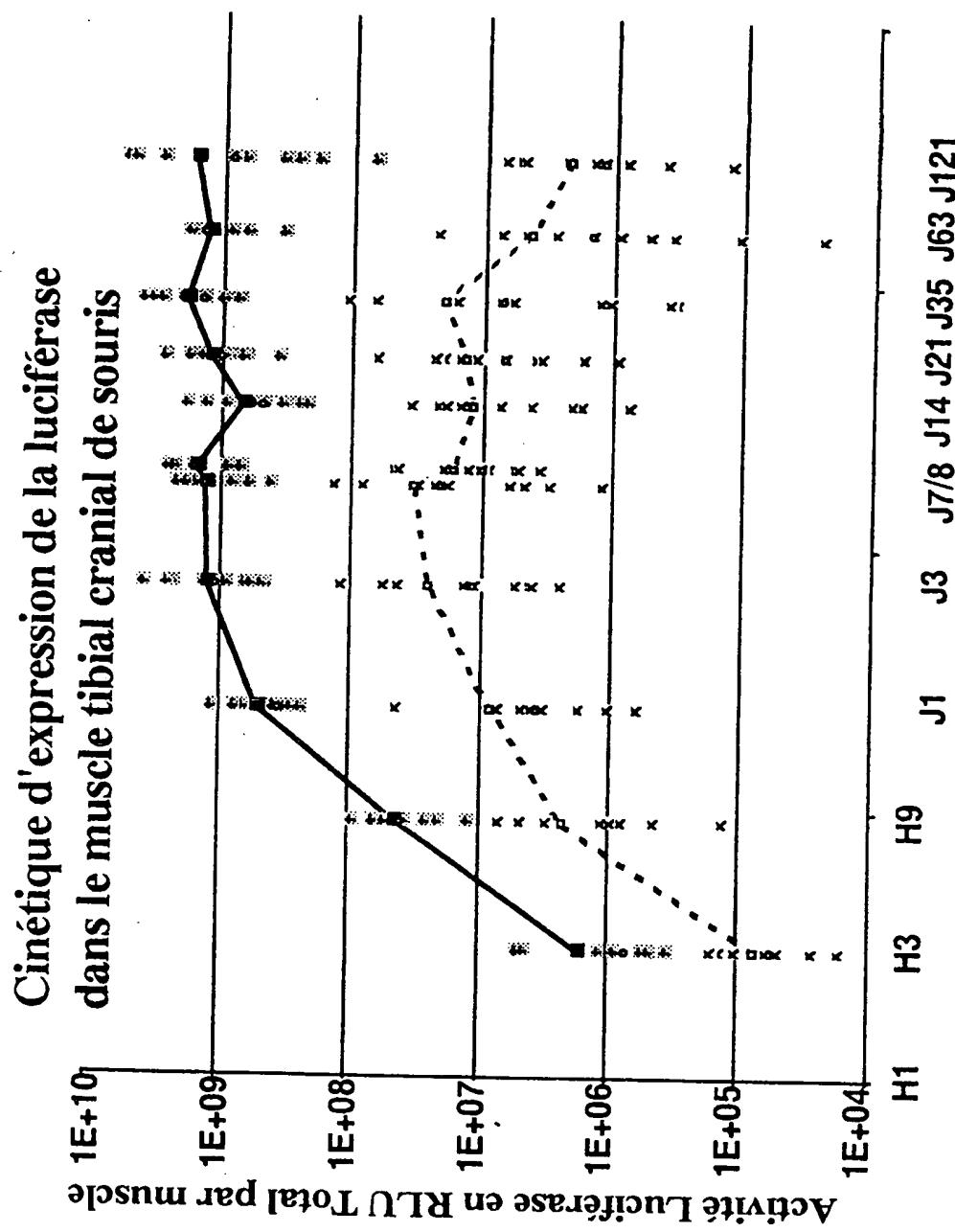


Figure 6

11 / 20

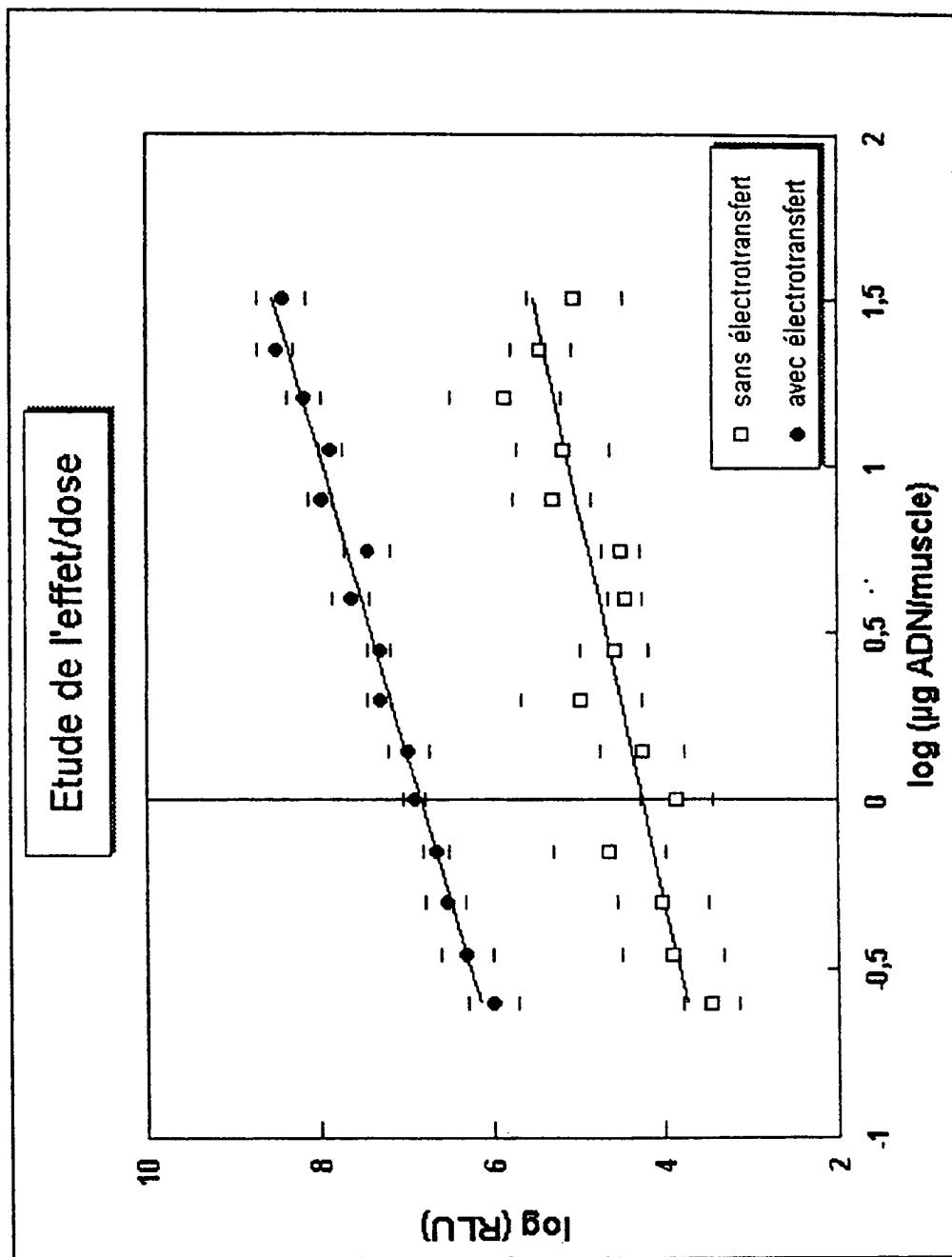


Figure 7

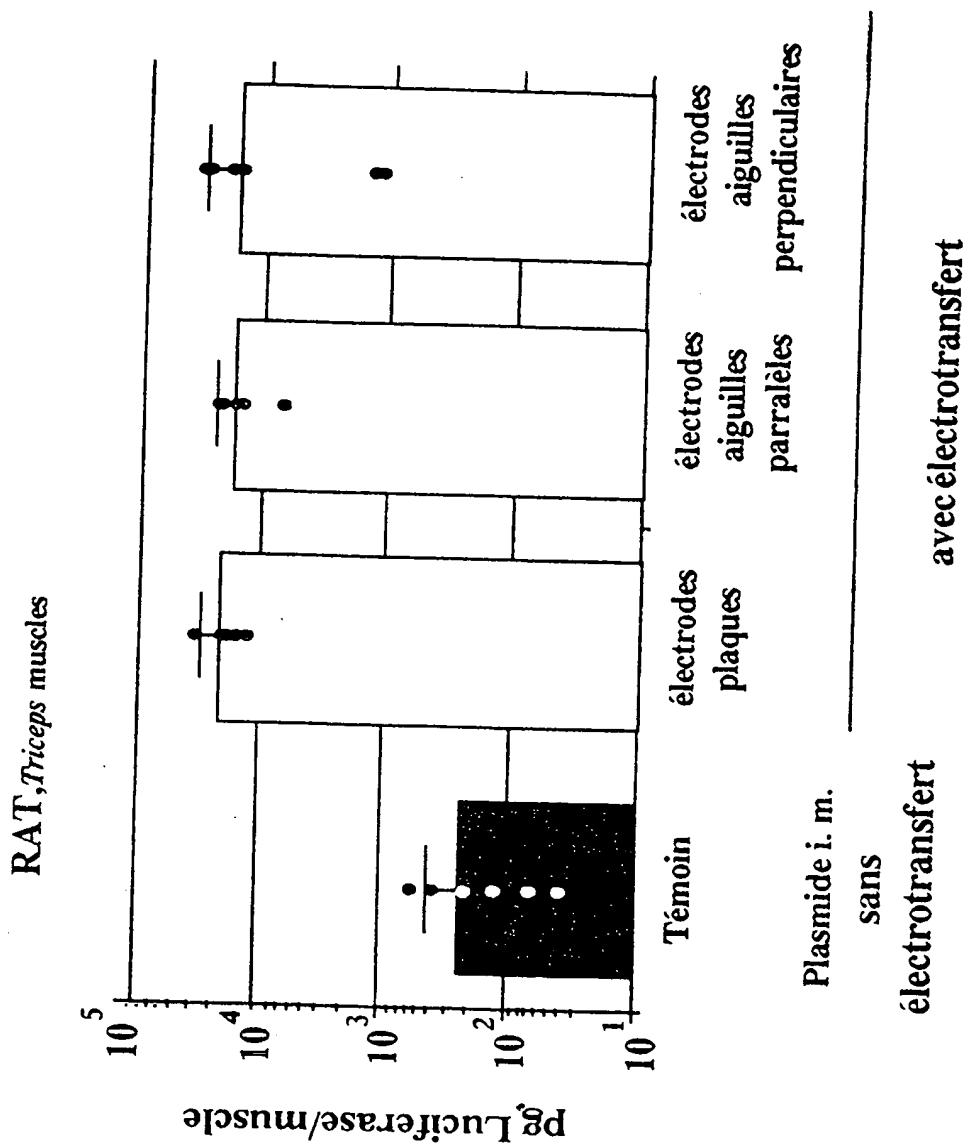


Figure 8

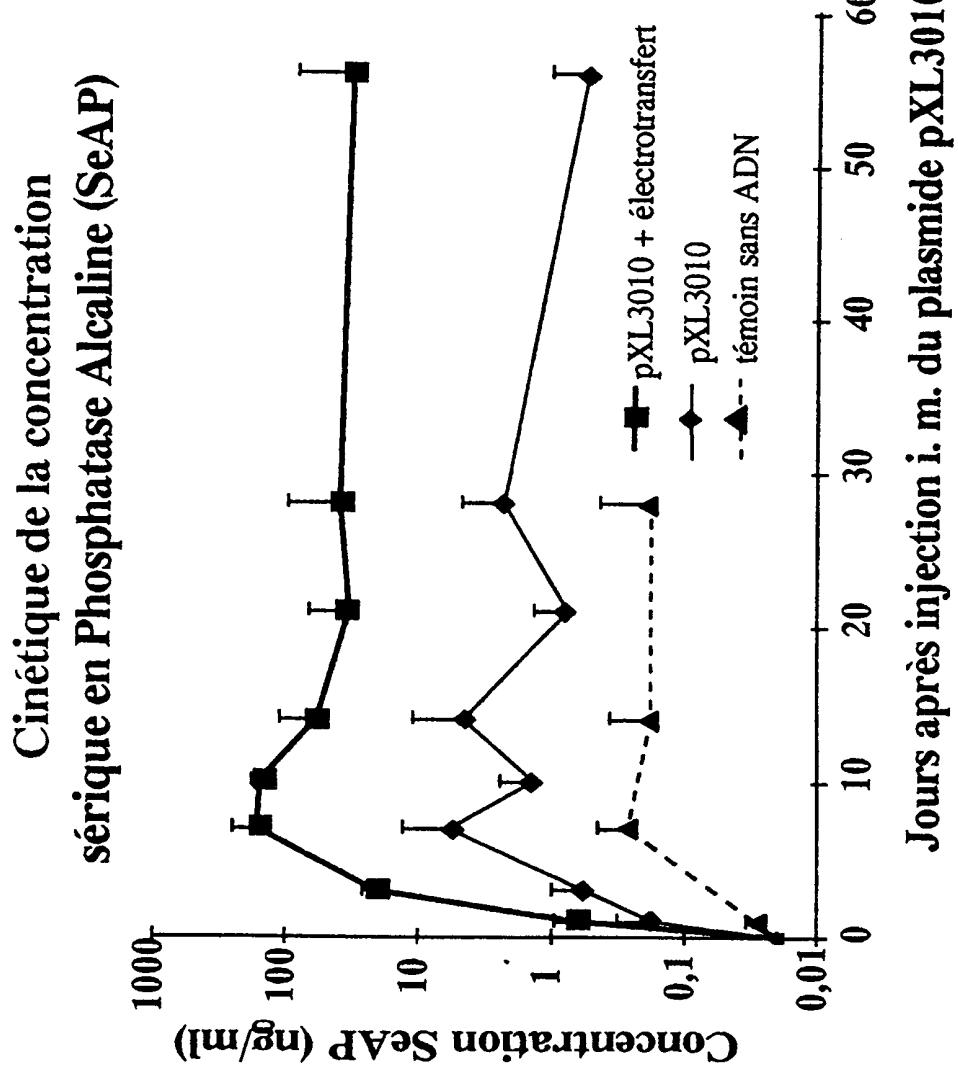


Figure 9

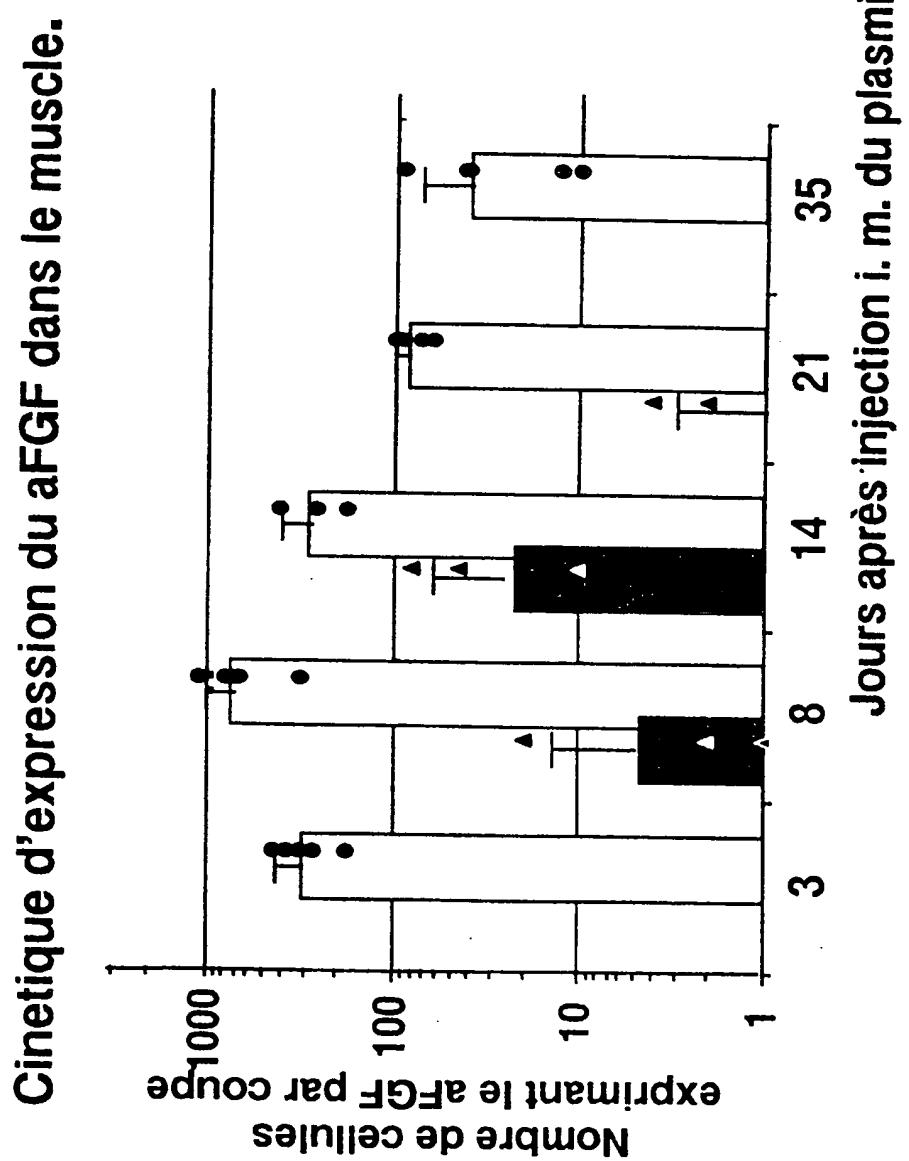


Figure 10

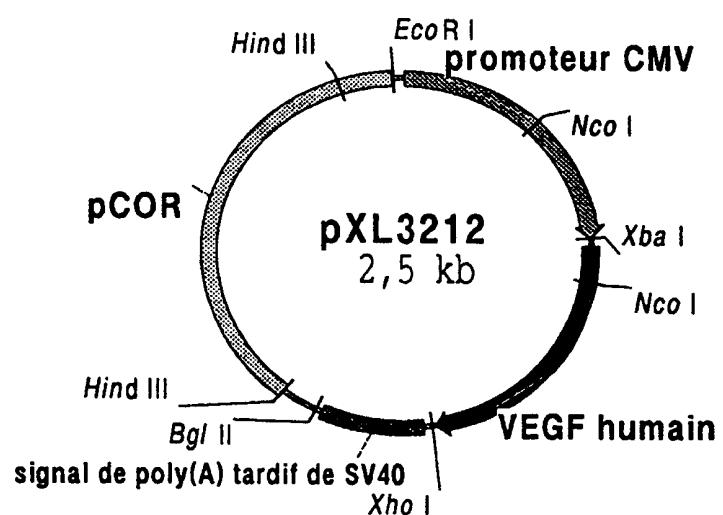
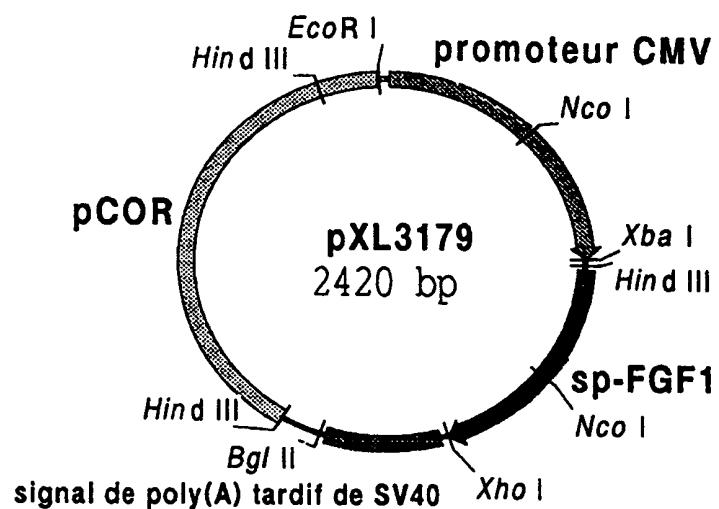


Figure 11

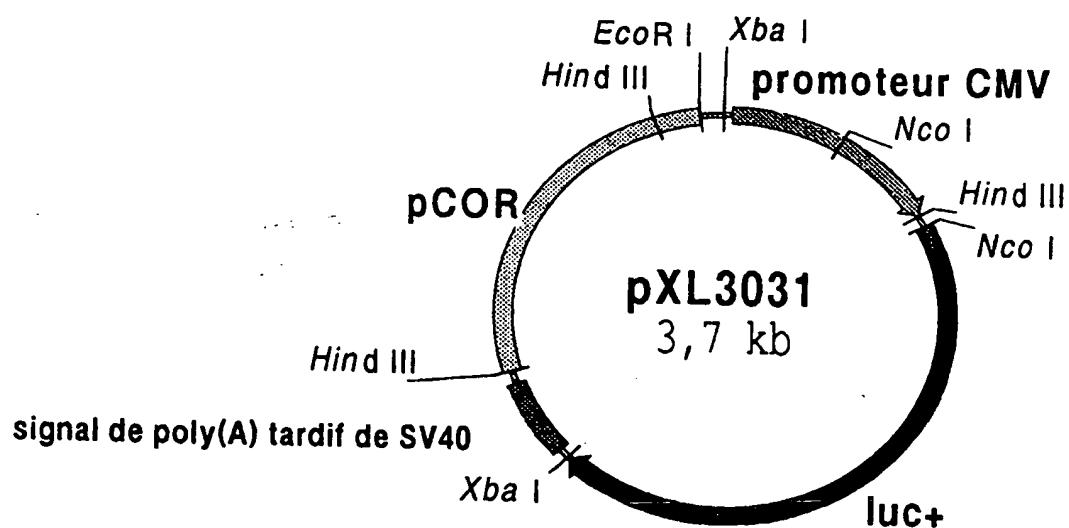
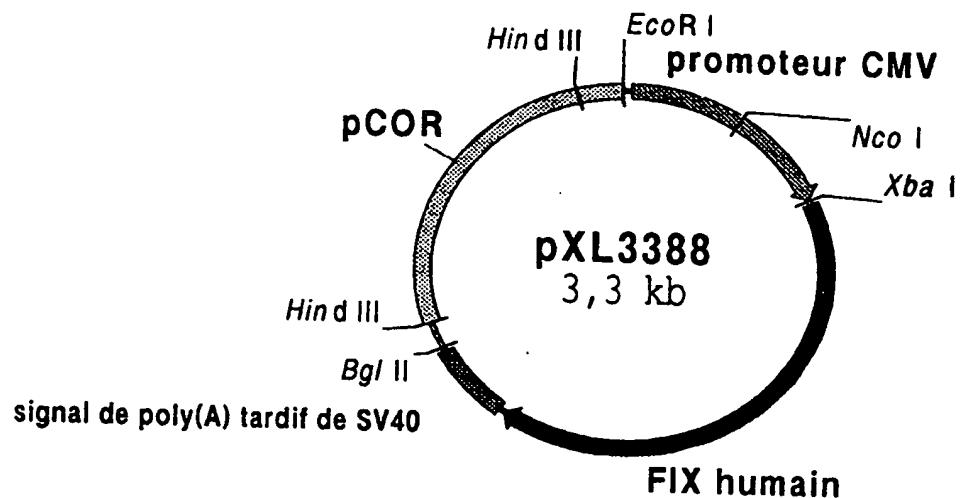


Figure 12

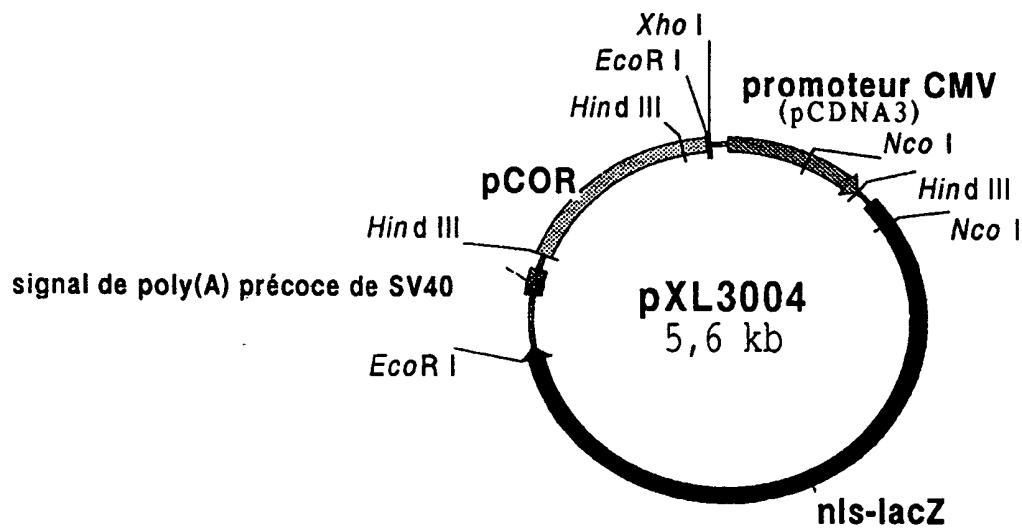
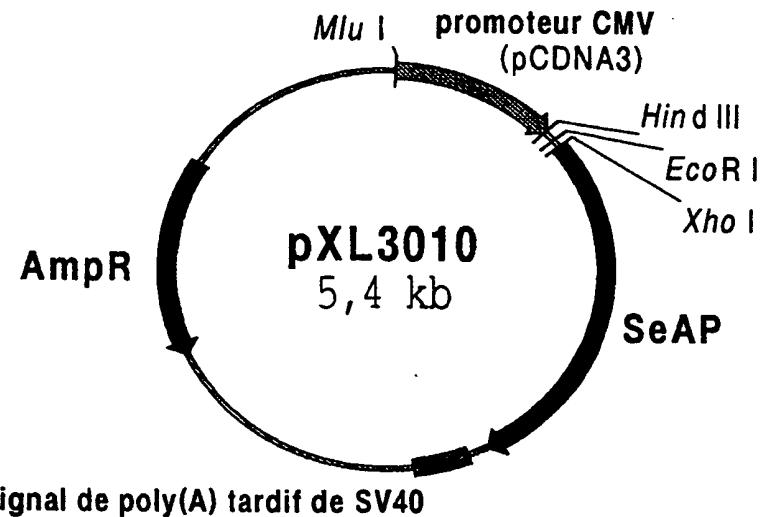


FIGURE 13

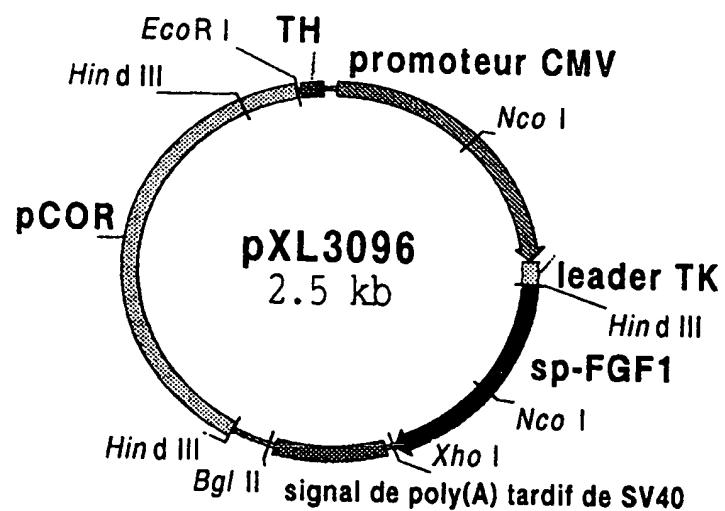
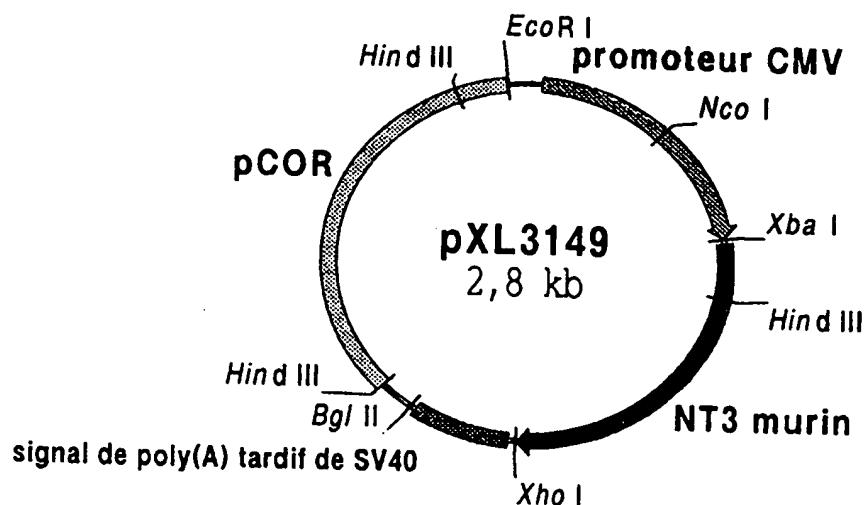


FIGURE 14

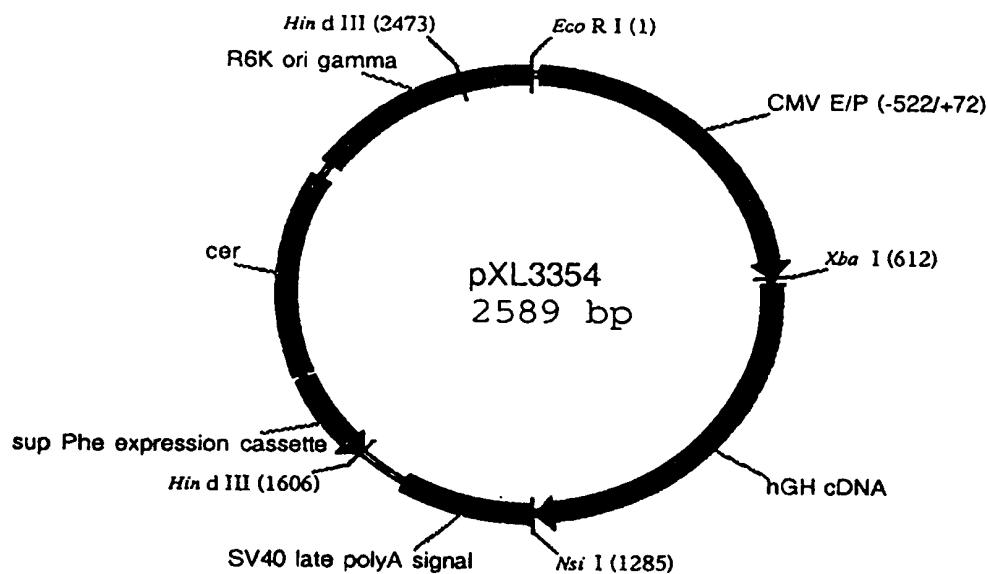
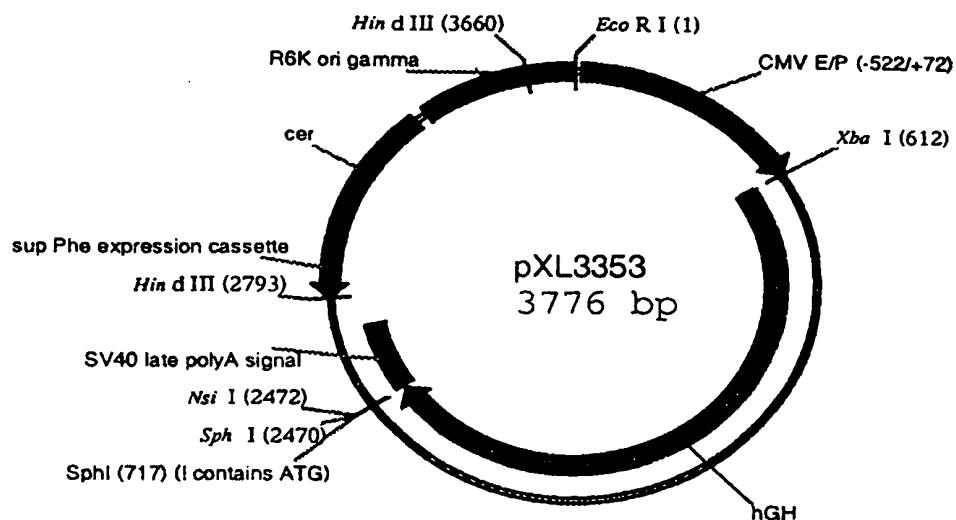


Figure 15

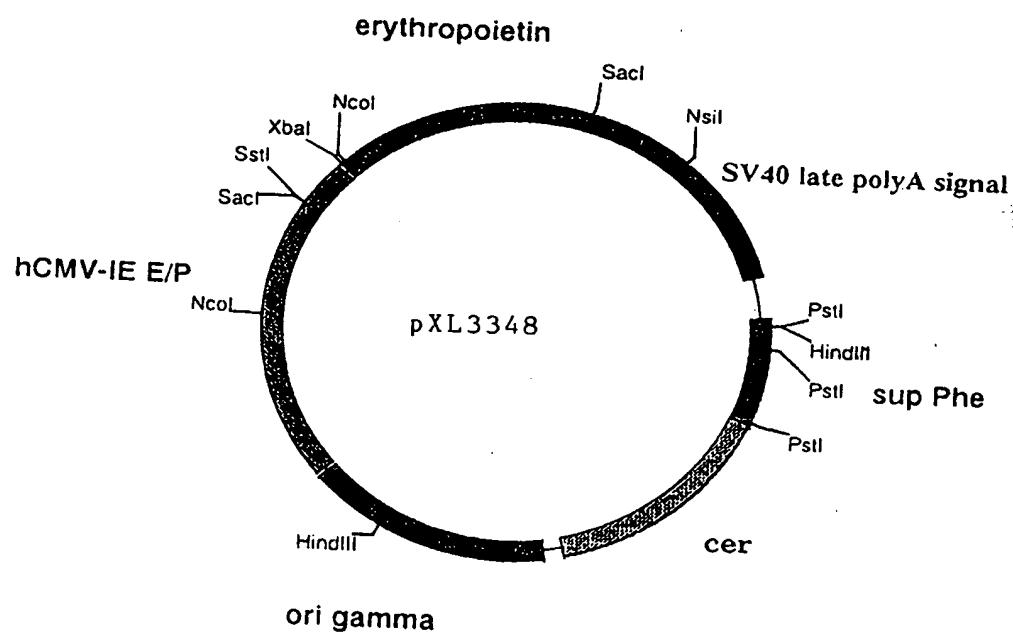


Figure 16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 98/01400

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 A61K48/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 14836 A (INCELL) 23 May 1996 see page 4, paragraph 1 - page 7, paragraph 1 see page 10, paragraph 1 - page 22 ---	1-84
X	WO 97 07826 A (CBR LAB INC ;UNIV SOUTH FLORIDA (US)) 6 March 1997 cited in the application see the whole document ---	1-84
X	WO 95 06129 A (THEREXSYS LTD ;KINGDON CRAIG R (GB); ANTONIOU MIKE (GB); DJEHA HAK) 2 March 1995 see the whole document ---	1-84
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
° Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 4 November 1998		Date of mailing of the international search report 10/11/1998
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Sitch, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 98/01400	
---	--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>HELLER ET AL: "IN VIVO GENE ELECTROINJECTION AND EXPRESSION IN RAT LIVER" FEBS LETTERS, vol. 389, 1996, pages 225-228, XP002058383 cited in the application see the whole document</p> <p>-----</p>	1-84
X	<p>NISHI ET AL: "HIGH-EFFICIENCY IN VIVO GENE TRANSFER USING INTRAARTERIAL PLASMID DNA INJECTION FOLLOWING IN VIVO ELECTROPORATION" CANCER RESEARCH, vol. 56, 1996, pages 1050-1055, XP002058384 see the whole document</p> <p>-----</p>	1-84

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 98/01400

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Observation: Although Claims 1-42 concern a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out on the effects attributed to the product/composition.

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/01400

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
WO 9614836	A 23-05-1996	US 5641680 A			24-06-1997
		AU 4138196 A			06-06-1996
WO 9707826	A 06-03-1997	AU 6855796 A			19-03-1997
WO 9506129	A 02-03-1995	AU 7465194 A			21-03-1995
		CA 2169828 A			02-03-1995
		EP 0725832 A			14-08-1996
		JP 9504425 T			06-05-1997
		US 5766902 A			16-06-1998

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Inde Internationale No
PCT/FR 98/01400

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 A61K48/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 96 14836 A (INCELL) 23 mai 1996 voir page 4, alinéa 1 - page 7, alinéa 1 voir page 10, alinéa 1 - page 22 ---	1-84
X	WO 97 07826 A (CBR LAB INC ;UNIV SOUTH FLORIDA (US)) 6 mars 1997 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-84
X	WO 95 06129 A (THEREXSYS LTD ;KINGDON CRAIG R (GB); ANTONIOU MIKE (GB); DJEHA HAK) 2 mars 1995 voir le document en entier ---	1-84 -/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle qu'il indique)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

4 novembre 1998

10/11/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Sitch, W

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

C INDE Internationale No
PCT/FR 98/01400

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>HELLER ET AL: "IN VIVO GENE ELECTROINJECTION AND EXPRESSION IN RAT LIVER" FEBS LETTERS, vol. 389, 1996, pages 225-228, XP002058383 cité dans la demande voir le document en entier</p> <p>-----</p>	1-84
X	<p>NISHI ET AL: "HIGH-EFFICIENCY IN VIVO GENE TRANSFER USING INTRAARTERIAL PLASMID DNA INJECTION FOLLOWING IN VIVO ELECTROPORATION" CANCER RESEARCH, vol. 56, 1996, pages 1050-1055, XP002058384 voir le document en entier</p> <p>-----</p>	1-84

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR 98/01400

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. Les revendications n°^{es}

se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:

Remarque: Bien que les revendications 1-42 concernent une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit/à la composition.

2. Les revendications n°^{es}

se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:

3. Les revendications n°^{es}

sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.

2. Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prétaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.

3. Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°^{es}

4. Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°^{es}

Remarque quant à la réserve

Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.

Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 98/01400

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)			Date de publication
WO 9614836 A	23-05-1996	US	5641680 A		24-06-1997
		AU	4138196 A		06-06-1996
WO 9707826 A	06-03-1997	AU	6855796 A		19-03-1997
WO 9506129 A	02-03-1995	AU	7465194 A		21-03-1995
		CA	2169828 A		02-03-1995
		EP	0725832 A		14-08-1996
		JP	9504425 T		06-05-1997
		US	5766902 A		16-06-1998

THIS PAGE BLANK (USPTO)